Ensaio APTIMA Neisseria gonorrhoeae

Para fins de diagnóstico *in vitro*.

Exclusivamente para exportação dos EUA.

Informações gerais 2
Utilização pretendida 2
Resumo e explicação do teste 2
Princípios do procedimento 3
Avisos e precauções 4
Requisitos de armazenamento e manuseamento dos reagentes 7
Colheita e armazenamento de espécimes 8
Interpretação do teste - controlo de qualidade/resultados do paciente . . . 39
Limitações 42
Resultados de Estudos Clínicos 44
Valores esperados dos Sistemas DTS 45
Desempenho clínico nos Sistemas DTS 48
Concordância dos espécimes clínicos no Sistema TIGRIS DTS 65
Desempenho analítico no Sistema TIGRIS DTS 69
Desempenho analítico no Sistema PANTHER 73
Bibliografia 75

Sistemas DTS 10
Reagentes e materiais fornecidos 10
Materiais necessários, mas disponíveis separadamente 12
Materiais Opcionais 13
Procedimento de Teste dos Sistemas DTS 14
Notas ao procedimento 19

Sistema TIGRIS DTS 24
Reagentes e materiais fornecidos 24
Materiais necessários, mas disponíveis separadamente 25
Materiais Opcionais 26
Procedimento de Teste do Sistema TIGRIS DTS 26
Notas ao procedimento 30

Sistema PANTHER 32
Reagentes e materiais fornecidos 32
Materiais necessários, mas disponíveis separadamente 33
Materiais Opcionais 34
Procedimento de teste do Sistema PANTHER 34
Notas ao procedimento 37

Informações gerais

Utilização pretendida

O ensaio APTIMA Neisseria gonorrhoeae é um teste de sonda de ácido nucleico alvo amplificado que utiliza a captura do alvo para a detecção qualitativa *in vitro* de RNA ribossómico (rRNA) de *Neisseria gonorrhoeae* (GC) para ajudar a diagnosticar doenças urogenitais gonocócicas utilizando o Sistema TIGRIS DTS ou o Sistema PANTHER ou a instrumentação semiautomática dos Sistemas DTS, conforme especificado. O ensaio pode ser utilizado para testar os seguintes espécimes de indivíduos sintomáticos: esfregaços colhidos pelo médico de origem endocervical, vaginal e uretral masculina; assim como espécimes de urina de ambos os sexos. O ensaio pode ser utilizado para testar os seguintes espécimes de indivíduos assintomáticos: esfregaços colhidos pelo médico de origem endocervical e vaginal, esfregaços vaginais colhidos pela paciente[1]; e espécimes de urina de ambos os sexos. Este ensaio destina-se também a ser utilizado na análise de espécimes ginecológicos de pacientes sintomáticas e assintomáticas. Estes espécimes cervicais colhidos nos frascos de solução PreservCyt podem ser testados antes ou depois do processamento citológico. O teste de espécimes já submetidos a processamento citológico está limitado a espécimes processados apenas com o ThinPrep 2000 System.

[1] Os esfregaços vaginais colhidos pelas pacientes constituem uma opção para o rastreio de mulheres quando não existem outras indicações para exame pélvico. O kit de colheita de espécimes de esfregaço vaginal não é para utilização domiciliar.

Resumo e explicação do teste

A infecção por *Neisseria gonorrhoeae* é uma das mais comuns infecções sexualmente transmissíveis em todo o mundo. Só nos Estados Unidos, em 2010, estima-se que tenham sido notificadas aos Centers for Disease Control 309.341 (100,8 por 100.000 habitantes) novos casos de GC (2).

A *N. gonorrhoeae* é o agente causador da gonorreia. As *Neisseria* são diplococos não-móveis e gram-negativos. A maioria das infecções gonorreicas são infecções descomplicadas do tracto genital inferior e devem ser assintomáticas. Contudo, se as infecções nas mulheres não forem tratadas, podem ascender e provocar doença inflamatória pélvica (DIP). PID pode se manifestar como endometrite, salpingite, peritonite pélvica, abcessos tubo-ovarianos. Uma percentagem menor de pessoas com infecções gonocócicas pode adquirir infecção gonocócica disseminada (IGD) (8, 11).

O diagnóstico convencional das infecções por GC exige que o organismo seja isolado em meio selectivo ou a observação de diplococos em esfregaços após coloração de Gram (9). Métodos de culturas podem ter boa sensibilidade clínica, mas são altamente dependentes do manuseamento adequado dos espécimes. O armazenamento e o transporte impróprios de espécimes podem resultar na perda de viabilidade do organismo e gerar resultados negativos incorrectos. Além disso, o uso de más técnicas de amostragem, materiais de amostragem tóxicos e a inibição do crescimento por componentes das secreções corporais podem também acarretar resultados negativos falsos (3, 10). Os métodos que não envolvem culturas habitualmente utilizados na detecção de GC incluem testes de sondas de DNA e testes de amplificação de ácidos nucleicos (nucleic acid amplification tests, NAAT).

Os NAAT de primeira geração para GC apresentam problemas tecnológicos que limitaram o seu desempenho. Estes problemas incluem um processamento de espécimes incómodo e a inibição de espécimes que podem originar resultados negativos falsos (6). O ensaio APTIMA Neisseria gonorrhoeae (ensaio APTIMA GC) é um NAAT de segunda geração

que utiliza tecnologias de captura de alvo, amplificação mediada por transcrição (Transcription-Mediated Amplification, TMA) e um ensaio de protecção da hibridação (Hybridization Protection Assay, HPA) para aperfeiçoar o processamento do espécime, ampliar o rRNA alvo e detectar produtos da amplificação, respectivamente. Os estudos que compararam o desempenho e inibição de espécimes de vários sistemas de amplificação demonstraram os benefícios da captura de alvo, da TMA e do HPA (4, 7).

De acordo com as Orientações para o Rastreio de *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae* de 2002, os CDC recomendam diversas opções para o seguimento de testes de rastreio positivos "se for de esperar um valor preditivo positivo baixo ou se um resultado positivo falso acarretar consequências psicossociais ou legais graves" (1). Uma destas opções de análise adicional pode consistir num teste de amplificação de ácidos nucleicos diferente, aprovado pela FDA, que utilize um alvo distinto do alvo do teste inicial. O ensaio APTIMA GC e o ensaio APTIMA COMBO 2 têm ambos como alvo a subunidade 16S de rRNA para a captura e detecção. A sonda de captura é a mesma para ambos os ensaios, mas o ensaio APTIMA GC reconhece para detecção uma região da subunidade 16S de rRNA diferente da reconhecida pelo APTIMA COMBO 2.

Princípios do procedimento

O ensaio APTIMA GC combina as tecnologias de captura de alvo, TMA e HPA.

Os espécimes são colhidos e transferidos em seus respectivos tubos de transporte de espécimes. A solução de transporte contida nestes tubos liberta o rRNA alvo e protege-o da degradação durante o armazenamento. Quando o ensaio APTIMA GC é realizado em laboratório, as moléculas de rRNA alvo são isoladas dos espécimes utilizando oligómeros de captura através de uma captura de alvos que utiliza micropartículas magnéticas. O oligómero de captura contém uma sequência complementar a uma região específica da molécula alvo, assim como uma cadeia de resíduos de desoxiadenosina. Durante o passo de hibridação, a região específica para a sequência do oligómero de captura liga-se a uma região específica da molécula alvo. O oligómero de captura:o complexo alvo é então capturado da solução ao reduzir a temperatura da sala de reacção para temperatura ambiente. Esta redução de temperatura permite que a hibridização ocorra entre a região de desoxiadenosina no oligómero de captura e as moléculas de poli-desoxitimidina que são ligadas de forma covalente às partículas magnéticas. As micropartículas, incluindo as moléculas alvo capturadas a elas ligadas, são arrastadas por ímans para o lado do recipiente de reacção, sendo o sobrenadante aspirado. As partículas são lavadas para remover matrizes de espécimes residuais, que podem conter inibidores da reacção de amplificação. Após a conclusão dos passos da captura de alvo, os espécimes estão prontos para a amplificação.

Os ensaios de amplificação de alvo são baseados na capacidade que os iniciadores oligonucleótidos complementares têm de efectuar hibridação específica, e permitem a amplificação enzimática das cadeias do ácido nucleico alvo. A reacção TMA da Gen-Probe replica uma região específica do rRNA da subunidade 16S de GC através de intermediários de DNA. É utilizado um conjunto exclusivo de iniciadores para a molécula alvo. A detecção das sequências de produto da amplificação de rRNA (amplicon) é alcançada com a utilização da hibridização do ácido nucleico. Uma sonda de DNA quimioluminescente de cadeia única, que é complementar a uma região do produto de amplificação alvo, é marcada com uma molécula de éster de acridínio. A sonda de DNA marcada combina-se com o produto de amplificação para formar híbridos RNA:DNA estáveis. O Reagente de selecção diferencia a sonda hibridizada da não-hibridizada, eliminando a geração de sinal da sonda não-hibridizada. Durante o passo de detecção, a luz emitida dos híbridos rotulados como RNA:DNA é medida como sinais de fotões num luminómetro, e são relatadas Unidades de luz relativa (RLU).

Avisos e precauções

A. Para fins de diagnóstico *in vitro*.

B. Para mais avisos, precauções e procedimentos para controlo de contaminação para o TIGRIS DTS System, consulte o *TIGRIS DTS System Operator's Manual (Manual do Operador do Sistema TIGRIS DTS)*.

C. Para mais avisos, precauções e procedimentos de controlo da contaminação para o Sistema PANTHER, consulte o *PANTHER System Operator's Manual (Manual do Operador do Sistema PANTHER)*.

Relacionado com o Laboratório

D. Utilize apenas artigos de laboratório descartáveis fornecidos ou especificados.

E. Adopte precauções de laboratório de rotina. Não coma, beba ou fume em áreas de trabalho designadas. Utilize luvas sem pó, descartáveis, óculos de protecção e batas de laboratório quando manusear espécimes e reagentes do kit. Lave bem as mãos após manusear os espécimes e os reagentes do kit.

F. **Aviso: irritantes, corrosivos.** Evitar o contacto de Auto Detect 1 e Auto Detect 2 com a pele, os olhos e as membranas mucosas. Lave com água se estes fluidos entrarem em contacto com a pele ou os olhos. Se estes fluidos se derramarem, dilua o derrame com água antes de secar com um pano.

G. As superfícies de trabalho, pipetas e outros equipamentos têm de ser regularmente descontaminados com solução de hipoclorito de sódio de 2,5% a 3,5% (0,35 M a 0,5 M).

Específicos dos Sistemas DTS

H. Recomenda-se vivamente a utilização de uma área separada para o HPA para minimizar a contaminação dos produtos de amplificação no ensaio. Esta área dedicada deve estar afastada das áreas de preparação de reagentes, captura de alvo e de amplificação.

I. Para ajudar a evitar a contaminação das áreas laboratoriais com produtos da amplificação, a área laboratorial deve ser disposta de forma a ter um fluxo de trabalho unidireccional: da preparação dos reagentes até ao HPA. Espécimes, equipamentos e reagentes não devem ser devolvidos à área onde um passo anterior tenha sido executado. Além disso, o pessoal não deve voltar para áreas de trabalho anteriores sem cumprir as devidas medidas de protecção contra contaminação.

Relacionado com os espécimes

J. Para a colheita de esfregaços endocervicais e uretrais masculinos, utilize apenas o kit APTIMA de colheita de esfregaços endocervicais e uretrais masculinos. Para a colheita de espécimes de urina, utilize apenas o kit APTIMA de colheita de espécimes de urina para espécimes de urina masculinos e femininos. Para esfregaços vaginais colhidos pela paciente e pelo médico, utilize apenas o kit APTIMA de colheita de esfregaços vaginais.

K. As datas de validade listadas nos kits de colheita referem-se ao local de colheita, e não à instalação de testes. As amostras colhidas em qualquer momento antes da data de validade do kit de colheita e transportadas e armazenadas de acordo com o folheto da embalagem são válidas para testes mesmo que a data de validade no tubo de colheita tenha passado.

L. A solução PreservCyt foi validada como meio alternativo para o teste com o ensaio APTIMA GC. Os espécimes citológicos em base líquida PreservCyt processados com o ThinPrep 3000 Processor ou outros instrumentos não foram avaliados para teste da *Neisseria gonorrhoeae* utilizando o ensaio APTIMA GC.

M. Após adicionar a urina ao tubo de transporte de urina, o nível de líquido tem de situar-se entre as duas linhas pretas indicadoras no rótulo do tubo. Caso contrário, o espécime deve ser rejeitado.

N. Mantenha condições de armazenamento adequadas durante o envio do espécime, para garantir a integridade do mesmo. A estabilidade do espécime sob condições de envio diferentes das recomendadas não foi avaliada.

O. Os espécimes podem ser infecciosos. Utilize Precauções Universais ao executar este ensaio. Métodos apropriados para manuseamento e descarte devem ser estabelecidos pelo director do laboratório. Apenas membros de equipa devidamente treinados no manuseamento de materiais infecciosos devem ter permissão para realizar este procedimento diagnóstico.

P. Evite a contaminação cruzada durante os passos de manuseamento dos espécimes. Os espécimes podem conter níveis extremamente altos de organismos. Certifique-se de que os recipientes de espécimes não contactam uns com os outros e elimine os materiais usados sem os passar por cima de recipientes abertos. Troque de luvas se elas entrarem em contacto com o espécime.

Q. Caso o laboratório receba um tubo de transporte de esfregaços que não contenha o esfregaço, contenha dois esfregaços, um esfregaço de limpeza, ou um esfregaço que não tenha sido fornecido pela Gen-Probe, o espécime deverá ser rejeitado. Antes de rejeitar um tubo de transporte de esfregaços sem o esfregaço, verifique se não é um Tubo APTIMA de Transferência de Espécimes, pois este não deve conter qualquer esfregaço.

R. No caso de espécimes citológicos em base líquida PreservCyt, faça a colheita de acordo com as instruções do fabricante. As alíquotas subsequentemente retiradas do frasco PreserCyt para teste com o ensaio APTIMA GC devem ser processadas utilizando apenas o kit de transferência de espécimes APTIMA.

S. Após a perfuração, o líquido pode vazar das tampas dos tubos de transporte APTIMA sob certas condições. Siga as instruções do *Procedimento de teste* adequado para impedir que isto aconteça.

Relacionados com o ensaio

T. O desempenho dos esfregaços vaginais não foi avaliado em grávidas.

U. O desempenho dos espécimes de esfregaços endocervicais, vaginais, uretrais masculinos e dos espécimes de urina feminina e masculina, assim como dos espécimes citológicos em base líquida PreservCyt, não foi avaliado em adolescentes com menos de 16 anos de idade.

V. Não utilize este kit após a data de validade.

W. Não troque, misture ou combine reagentes de ensaio provenientes de kits com números de lote diferentes. Os controlos e fluidos do ensaio APTIMA podem apresentar números de lote diferentes.

Específicos dos Sistemas DTS

X. Pontas com encaixes hidrofóbicos devem ser usadas. No mínimo, é necessário dedicar duas pipetas de repetição ao uso com este ensaio: uma para utilizar nos passos de captura do alvo e amplificação e outra para utilizar nos passos de HPA. É necessário dedicar duas micropipetas ao uso com este ensaio: uma para utilizar na transferência de espécimes e outra para utilizar na preparação de reagentes. Todas as pipetas têm de ser limpas regularmente da forma descrita em *Procedimento de Teste dos Sistemas DTS*, *Notas ao procedimento*.

Y. Ao utilizar pipetas de repetição para adição de reagentes, não toque o tubo com a ponta da pipeta para evitar a passagem de um tubo para outro.

Z. A mistura adequada é necessária para alcançar resultados acurados nos ensaios. Para obter todos os dados consulte o *Procedimento de Teste dos Sistemas DTS*, *Notas ao procedimento*.

AA. É necessário dedicar banhos de água separados para os passos de captura do alvo, amplificação e HPA do ensaio.

AB. A reprodutibilidade foi estabelecida utilizando meio de transporte de esfregaços misturado com rRNA. A reprodutibilidade ao testar os espécimes de esfregaços contendo o organismo alvo não foi determinada.

AC. Os cartões de selagem devem ser eliminados em recipientes para resíduos imediatamente após removê-los dos tubos de reacção. Devem sempre utilizar-se cartões de selagem novos: estes nunca deverão ser reutilizados de passos anteriores. Os cartões de selagem devem ser fixados firmemente ao topo de todos os tubos de reacção.

Requisitos de armazenamento e manuseamento dos reagentes

A. Os seguintes reagentes são estáveis quando armazenados entre 2 °C e 8 °C (refrigerados):

   Reagente de amplificação APTIMA para GC

   Reagente enzimático APTIMA

   Reagente de sonda APTIMA para GC

   Reagente de captura do alvo B APTIMA

   Controlo Positivo APTIMA, GC / Controlo Negativo, CT

   Controlo Positivo APTIMA, CT / Controlo Negativo, GC

B. Os seguintes reagentes são estáveis quando armazenados entre 2 °C e 30 °C:

   Solução de reconstituição de amplificação APTIMA para GC

   Solução de reconstituição para reagente enzimático APTIMA

   Solução de reconstituição de sonda APTIMA para GC

   Reagente de selecção APTIMA

C. Os seguintes reagentes são estáveis quando armazenados entre 15 °C e 30 °C (temperatura ambiente):

   Reagente de captura do alvo APTIMA para GC

   Solução de Lavagem APTIMA

   Tampão para o fluido de desactivação APTIMA

   Reagente a Óleo APTIMA

D. O reagente de captura do alvo de trabalho para GC (Working Target Capture Reagent GC, wTCR GC) é estável durante 60 dias quando armazenado entre 15 °C e 30 °C. Não refrigere.

E. Após a reconstituição, o reagente enzimático, o reagente de amplificação para GC e o reagente de sonda para GC são estáveis durante 60 dias quando armazenado entre 2 °C e 8 °C.

F. Elimine os reagentes reconstituídos e wTCR não utilizados após 60 dias ou depois de a data de validade do lote principal passar, o que acontecer primeiro.

G. Os controlos são estáveis até à data indicada nos frascos.

H. Os reagentes dos frascos de 50 testes armazenados no Sistema TIGRIS DTS têm uma estabilidade de 48 horas no instrumento.

I. Os reagentes dos frascos de 100 testes armazenados no Sistema TIGRIS DTS têm uma estabilidade de 96 horas no instrumento.

J. Os reagentes armazenados no Sistema PANTHER têm uma estabilidade de 72 horas no instrumento.

K. O reagente de sonda para GC e o reagente de sonda para GC reconstituído são fotossensíveis. Armazene os reagentes ao abrigo da luz.

L. Com o aquecimento à temperatura ambiente, alguns tubos de controlo podem parecer nublados ou apresentar precipitações. A névoa ou precipitação associada aos controlos não afecta o desempenho do controlo. Os controlos podem ser usados mesmo que estejam nublados ou precipitados. Caso se pretendam controlos límpidos, a solubilização pode ser agilizada incubando-os no extremo superior do intervalo de temperatura ambiente (15 °C a 30 °C).

M. Não congele os reagentes.

Colheita e armazenamento de espécimes

O ensaio APTIMA GC foi concebido para detectar a presença de GC em esfregaços colhidos pelo médico de origem endocervical, vaginal e uretral masculina; esfregaços vaginais colhidos pela paciente, espécimes de urina de ambos os sexos e espécimes citológicos em base líquida PreservCyt. Não foi avaliado o desempenho com outros espécimes que não os colhidos com os seguintes kits de colheita:

- Kit Unissexo APTIMA de Colheita de Espécimes de Esfregaço para Espécimes de Esfregaço Endocervical e da Uretra Masculina
- Kit APTIMA de Colheita de Espécimes de Urina para Espécimes de Urina Masculina e Feminina
- Kit APTIMA de colheita de esfregaços vaginais
- Kit de transferência de espécimes APTIMA (para utilização com amostras ginecológicas colhidas em solução PreservCyt)

A. Instruções de colheita:

Consulte o folheto da embalagem do respectivo kit de colheita de espécimes para instruções de colheita.

B. Transporte e armazenamento de espécimes antes do teste:

1. Espécimes de esfregaço:
   a. Após a colheita, transporte e armazene os esfregaços no tubo de transporte de esfregaços a uma temperatura entre 2 °C e 30 °C até à análise. Os espécimes têm de ser analisados com o ensaio APTIMA GC no espaço de 60 dias após a colheita. Caso seja necessário um armazenamento mais prolongado, congele a uma temperatura entre -20 °C a -70 °C durante até 12 meses após a colheita (ver *Estudos de estabilidade dos espécimes*).
2. Espécimes de urina:
   a. As amostras de urina que permaneçam ainda no recipiente primário de colheita têm de ser transportadas para o laboratório a uma temperatura entre 2 °C e 30 °C. Transfira a amostra de urina ao tubo de transporte de espécimes de urina APTIMA em até 24 horas após a colheita. Armazene a uma temperatura entre 2 °C e 30 °C e teste nos 30 dias posteriores à colheita.
   b. Após a colheita, transporte os espécimes de urina processada no tubo de transporte APTIMA de espécimes de urina a uma temperatura entre 2 °C e 30 °C e armazene a 2 °C e 30 °C até à análise. Os espécimes de urina processados devem ser analisados com o ensaio APTIMA GC no espaço de 30 dias após a colheita. Caso seja necessário um armazenamento mais prolongado, congele a uma temperatura entre -20 °C a -70 °C durante até 12 meses após a colheita (ver *Estudos de estabilidade dos espécimes*).

3. Espécimes citológicos em base líquida PreservCyt:
   a. Os espécimes citológicos em base líquida PreservCyt destinados a análise de GC têm de ser processados para citologia e/ou transferidos para um tubo de transferência de espécimes APTIMA no espaço de 30 dias após a colheita quando armazenados entre 2 ºC e 30 ºC (ver *Estudos de estabilidade dos espécimes*).
   b. Caso se utilize o procedimento de remoção de alíquotas de ThinPrep, consulte o *ThinPrep 2000 ou ThinPrep 3000 Processor Operator's Manual—Addendum (Adenda do Manual do operador do ThinPrep 2000 Processor ou do ThinPrep 3000 Processor)*. Transfira 1 mL da alíquota retirada para um tubo de transferência de espécimes APTIMA de acordo com as instruções do folheto informativo do kit de transferência de espécimes APTIMA.
   c. Caso analise o espécime após o processamento no ThinPrep 2000 Processor, processe o espécime citológico em base líquida PreservCyt de acordo com o *ThinPrep 2000 Processor Operator's Manual (Manual do operador do ThinPrep 2000 Processor)* e o folheto informativo do kit de transferência de espécimes APTIMA. Transfira 1 mL do fluido restante no frasco de solução PreservCyt para um tubo de transferência de espécimes APTIMA de acordo com as instruções do folheto informativo do kit de transferência de espécimes APTIMA.
   d. Depois de o espécime citológico em base líquida PreservCyt ser transferido para o tubo de transferência de espécimes APTIMA, o espécime tem de ser ensaiado com o ensaio APTIMA GC no espaço de 30 dias quando armazenado entre 2 °C e 8 °C ou de 14 dias quando armazenado entre 15 °C e 30 °C. Caso seja necessário um armazenamento mais prolongado, congele a uma temperatura entre -20 °C e -70 °C durante até 12 meses após a transferência (ver *Estudos de estabilidade dos espécimes*).

C. Armazenamento de espécimes após o teste:
   1. Os espécimes que foram testados devem ser armazenados em posição vertical num suporte.
   2. Os tubos de transporte de espécimes devem ser cobertos com uma película plástica nova e limpa ou com folha de alumínio.
   3. Caso as amostras testadas precisem ser congeladas ou despachadas, remova a tampa perfurável e coloque novas tampas não-perfuráveis nos tubos de transporte de espécimes. Caso os espécimes precisem ser despachados para teste em outro local, as temperaturas recomendadas deverão ser mantidas. Antes de destapar amostras anteriormente testadas e novamente tapadas, os tubos de transporte de espécimes devem ser centrifugados por 5 minutos a 420 RCF (força centrífuga relativa) para levar todo o líquido para o fundo do tubo. **Evite salpicos e contaminação cruzada.**

Nota: *Os espécimes têm de ser transportados de acordo com os regulamentos de transporte nacionais e internacionais em vigor.*

Sistemas DTS

Os reagentes do ensaio APTIMA GC são indicados abaixo para os Sistemas DTS. Os Símbolos para Identificação dos Reagentes também são listados junto ao nome do reagente.

Reagentes e materiais fornecidos

Kit do ensaio APTIMA Neisseria gonorrhoeae, 100 testes (2 caixas) (Ref.ª Cat. 301091)

Caixa refrigerada do ensaio APTIMA Neisseria gonorrhoeae (Caixa 1 de 2) (armazenar entre 2 °C e 8 °C após recepção)

Símbolo	Componente	Quantidade
A	**Reagente de amplificação APTIMA para GC** *Ácidos nucleicos não infecciosos secos em solução tamponada contendo < 5% de agente de volume.*	1 frasco
E	**Reagente enzimático APTIMA** *Transcriptase reversa e RNA polimerase secos em solução tamponada HEPES contendo < 10% de reagente de volume.*	1 frasco
P	**Reagente de sonda APTIMA para GC** *Sondas de DNA quimioluminescentes não-infecciosas secas em solução tamponada com succinato contendo < 5% de detergente.*	1 frasco
TCR-B	**Reagente de captura do alvo B APTIMA** *Ácido nucleico não infeccioso em solução tamponada contendo < 5% de detergente.*	1 x 0,35 mL
PGC/ NCT	**Controlo Positivo APTIMA, GC / Controlo Negativo, CT** *Ácido nucleico de GC não infeccioso em solução tamponada contendo < 5% de detergente. Cada amostra de 400 µL contém rRNA que se estima ser equivalente a 50 células de GC (250 fg/ensaio*).*	3 x 1,7 mL
PCT/ NGC	**Controlo Positivo APTIMA, CT / Controlo Negativo, GC** *Ácido nucleico de CT não infeccioso em solução tamponada contendo < 5% de detergente. Cada amostra de 400 µL contém rRNA que se estima ser equivalente a 1 unidade formadora de inclusões (inclusion forming unit, IFU) de CT (5 fg/ensaio*).*	3 x 1,7 mL

*Os equivalentes rRNA foram calculados com base no tamanho do genoma e a taxa estimada média/célula DNA:RNA de cada organismo.

A caixa refrigerada contém também os seguintes artigos (tabuleiro de armazenamento): (armazenar entre 2 °C e 30 °C após recepção)

Símbolo	Componente	Quantidade
AR	**Solução de reconstituição de amplificação APTIMA para GC** *Solução aquosa contendo conservantes.*	1 x 9,3 mL
ER	**Solução de reconstituição para reagente enzimático APTIMA** *Solução tampão HEPES contendo um surfactante e glicerol.*	1 x 3,3 mL
PR	**Solução de reconstituição de sonda APTIMA para GC** *Solução tamponada de succinato contendo < 5% de detergente.*	1 x 12,4 mL
S	**Reagente de selecção APTIMA** *Solução tamponada com borato a 600 mM contendo surfactante.*	1 x 31 mL
	Colarinho de Reconstituição	3
	Cartão de Selagem	1 embalagem

Caixa APTIMA Neisseria gonorrhoeae de temperatura ambiente (Caixa 2 de 2) (armazenar entre 15 °C e 30 °C após recepção)

Símbolo	Componente	Quantidade
TCR	**Reagente de captura do alvo APTIMA para GC** *Solução salina tamponada contendo fase sólida e oligómeros de captura.*	1 x 22 mL
W	**Solução de Lavagem APTIMA** *Solução tamponada com HEPES a 10 mM contendo < 2% de detergente.*	1 x 402 mL
DF	**Tampão para o fluido de desactivação APTIMA** *800 mM solução tamponada de bicarbonato.*	1 x 402 mL
O	**Reagente a Óleo APTIMA** *Óleo de Silicone*	1 x 24,6 mL

Materiais necessários, mas disponíveis separadamente

Nota: *Excepto indicação em contrário, as referências de catálogo dos materiais disponibilizados pela Gen-Probe são mencionadas.*

	Ref.ª Cat.
Luminómetro LEADER HC+	104747-01
Sistema de captura do alvo (Target Capture System, TCS) GEN-PROBE	104555
Incubadoras e vórtex:	
2 Misturadoras em vórtex multi-tubo	*102160*
3 Banhos de água com circulação (62 °C ± 1 °C, 42 °C ± 1 °C, 62 °C ± 1 °C)	*104586*
3 Espaçadores para banhos de água	*104627*
OU	
2 Banhos de calor seco/Vórtexes SB100	*105524*
Podem ser necessários mais banhos SB100 se o volume de testes aumentar	
Kit de auto-detecção APTIMA	301048
2 pipetas eppendorf Repeater Plus	105725
2 pipetas, 1.000 µL RAININ PR1000	901715
Pipeta eppendorf, 20 µL a 200 µL	105726
Pontas para pipeta de repetição, 2,5 mL	21-381-329
Pontas para pipeta de repetição, 5,0 mL	21-381-330
Pontas para pipeta de repetição, 25,0 mL	21-381-115
Pontas, P1000 Style *ponta de diâmetro especial apenas disponível na Gen-Probe*	105049
Pontas de pipeta 20 µL a 200 µL	705512 (Fisher)
Unidades de dez tubos (Ten Tube Units, TTU)	TU0022
Cassetes de dez pontas (Ten Tip Cassettes, TTC)	104578
Kit Unissexo APTIMA de Colheita de Espécimes de Esfregaço para Espécimes de Esfregaço Endocervical e da Uretra Masculina	301041
Kit APTIMA de colheita de espécimes de urina para espécimes de urina masculinos e femininos	301040
Tubos de transporte APTIMA para espécimes de urina para espécimes de urina masculinos e femininos	105575
Kit APTIMA de colheita de esfregaços vaginais	301162
Kit de transferência de espécimes APTIMA	301154C
Padrão de calibração SysCheck	301078
Lixívia, solução de hipoclorito de sódio 5% a 7% (0,7 M a 1,0 M)	—
Recipientes padrão para colheita de urina, sem conservantes	—
Recipiente plástico com tampa grande	—
Tampas penetráveis APTIMA	105668
Tampas não-penetráveis de substituição	103036A

Materiais Opcionais

	Ref.ª Cat.
Kit de controlos APTIMA	301110
Fluidos do ensaio APTIMA *Solução de lavagem APTIMA, tampão para o fluido de desactivação APTIMA e reagente a óleo APTIMA*	302002C
Reforço de lixívia GEN-PROBE *para a limpeza de rotina de superfícies e equipamento*	302101
Painel de competência de DST	102325
Pontas, 1.000 µL condutoras, com sensor de líquido	10612513 (Tecan)
TECAN Freedom EVO 100/4 contendo *Sistemas DTS 800 APTIMA COMBO 2* *Placa do tabuleiro* *105200* *Reservatório de reagentes (quarto de módulo de 40 mL)* *104765* *Reservatório de reagentes dividido (quarto de módulo de 19 mL x 2)* *104763*	900932

Procedimento de Teste dos Sistemas DTS

A. Preparação do Equipamento

1. Ajuste um banho de água a 62 °C ± 1 °C (para captura do alvo e hibridação do iniciador), um segundo banho de água a 42 °C ± 1 °C (para amplificação) e um terceiro banho de água a 62 °C ± 1 °C (para HPA). Se o banho de calor seco/vórtex SB100 estiver a ser utilizado consulte a *SB100 Dry Heat Bath/Vortexer Application Sheet (Ficha de aplicação do Banho de calor seco/vórtex SB100)(SB100 Application Sheet [Ficha de aplicação do SB100])*.
2. Antes do início do ensaio, limpe as superfícies de trabalho e pipetas com solução de hipoclorito de sódio de 2,5% a 3,5% (0,35 M a 0,5 M). Deixe a solução de hipoclorito de sódio em contacto com as superfícies e pipetas durante pelo menos 1 minuto, enxaguando-as depois com água. Não deixe secar a solução de hipoclorito de sódio. Cubra a superfície da bancada onde os testes serão realizados com capas absorventes para bancadas de laboratórios com forro plástico.
3. Coloque um número suficiente de Dez Cassetes de Pontas no Sistema de Captura de Alvo (TCS). Assegure-se de que o frasco de lavagem do TCS esteja cheio com a Solução de Lavagem APTIMA e que o distribuidor de aspirado esteja conectado à bomba de vácuo. (Consulte o *Target Capture System Operator's Manual [Manual do Operador do Sistema de Captura de Alvo]*).

B. Reconstituição de Reagentes

Nota: *A reconstituição dos reagentes deve ser feita antes de se iniciar a transferência de espécimes.*

1. Para reconstituir os reagentes de amplificação GC, enzimático e de sonda GC, combine os frascos do reagente liofilizado com a solução de reconstituição. Se estiverem refrigeradas, deixe as soluções de reconstituição alcançar a temperatura ambiente antes de serem utilizadas.
   a. Emparelhe a solução de reconstituição adequada com o reagente liofilizado. As etiquetas são codificadas por cores para serem correctamente emparelhadas.
   b. Abra o frasco de reagente liofilizado e insira com firmeza a extremidade ranhurada do colarinho de reconstituição na abertura do frasco (Figura 1, Passo 1).
   c. Abra o frasco da solução de reconstituição correspondente, e deposite a tampa sobre uma superfície de trabalho limpa e coberta.
   d. Enquanto segura o frasco da solução de reconstituição na bancada, insira firmemente a outra extremidade do colarinho de reconstituição na abertura do frasco (Figura 1, Passo 2).
   e. Inverta lentamente o conjunto do frasco do reagente e do frasco de solução. Permita que a solução escoe do frasco de solução para o frasco de reagente (Figura 1, Passo 3).
   f. Agite suavemente a solução no frasco para misturar. Evite a criação de espuma enquanto agita o frasco (Figura 1, Passo 4).
   g. Aguarde que o reagente liofilizado entre em solução e depois inverta novamente o conjunto de frascos, inclinando-o a um ângulo de 45° para minimizar a formação de espuma (Figura 1, Passo 5). Permita que todo o líquido escoe para o frasco.
   h. Retire o colarinho de reconstituição do frasco (Figura 1, Passo 6).
   i. Volte a colocar a tampa no frasco. Anote as iniciais do operador e a data de reconstituição na etiqueta (Figura 1, Passo 7).

j. Elimine o colarinho de reconstituição e o frasco (Figura 1, Passo 8).

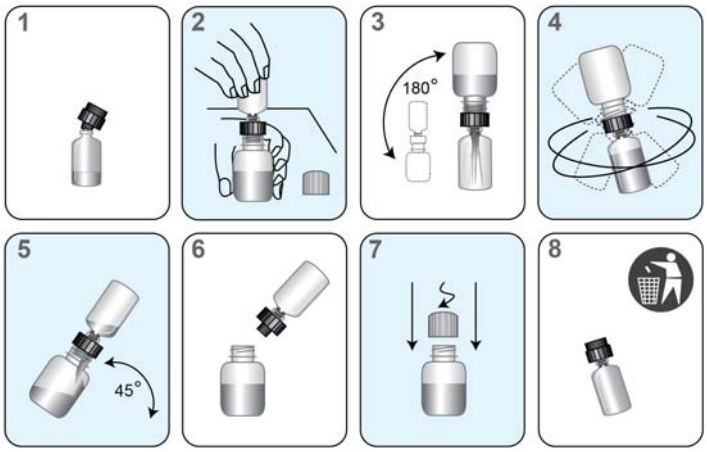

Figura 1. Processo de reconstituição nos Sistemas DTS

2. Os reagentes de sonda GC, amplificação GC e enzimático previamente reconstituídos têm de atingir a temperatura ambiente (15 °C a 30 °C) antes do início do ensaio. Caso o Reagente de Sonda contenha precipitado que não retorne à solução em temperatura ambiente, aqueça-o a 62 °C por 1 a 2 minutos. Após este passo de aquecimento, o Reagente de Sonda pode ser usado mesmo se ainda houver precipitado residual. Após a nova suspensão, misture invertendo suavemente, com cuidado para não induzir a formação de espuma.

Nota: *Este passo de inversão deve ser executada a qualquer momento em que o precipitado seja levado à solução, seja aquecendo-o a 62 °C ou à temperatura ambiente.*

3. Prepare o reagente de captura do alvo de trabalho GC (Working Target Capture Reagent, wTCR GC).
   a. Transfira 20 mL do TCR GC para um recipiente dedicado, limpo e seco, de tamanho adequado.
   b. Utilizando uma micropipeta, adicione 200 µL de TCR-B ao TCR GC.
   c. Misture completamente a solução com movimentos circulares.
   d. Etiquete o recipiente. Registe as iniciais do operador, data de preparação, e ambos números de lote.

Nota: *Para um número menor de reacções (espécimes e controlos), utilize os seguintes dados para calcular os volumes de TCR GC e TCR-B:*

Volume de TCR (mL) = (número de reacções + 5 reacções extra) x 0,1 mL

Volume de TCR-B (mL) = Volume de TCR (mL) / 100

C. Captura de Alvo (Target Capture)

A pipeta de repetição usada na captura de alvo e amplificação deve ser dedicada para utilização somente nestes passos. Consulte a secção *Avisos e precauções* para mais informações.

Preparação dos Suportes

1. Deixe que os espécimes e controlos alcancem a temperatura ambiente antes do processamento.
2. **Não agite os espécimes no vórtex.**

3. Confirme visualmente se todos os tubos de espécimes cumprem um dos seguintes critérios:
   a. Presença de uma única zaragatoa de colheita azul APTIMA num tubo de transporte de esfregaços unissexo.
   b. Presença de uma única zaragatoa de colheita cor-de-rosa APTIMA num tubo de transporte de esfregaços vaginais.
   c. Volume final de urina entre as linhas de enchimento pretas dos tubos de transporte de espécimes de urina.
   d. Ausência de zaragatoa no tubo de transporte de espécimes APTIMA para espécimes citológicos em base líquida PreservCyt.
4. Inspeccione os tubos de espécimes antes de os perfurar:
   a. Caso um tubo de espécime contenha bolhas no espaço entre o líquido e a tampa, centrifugue o tubo por 5 minutos com 420 RCF para eliminar as bolhas.
   b. Caso um tubo de espécime apresente um volume menor do que o habitualmente observado quando se seguem as instruções de colheita, centrifugue o tubo por 5 minutos com 420 RCF para garantir que o líquido não fique retido na tampa.
   c. Se o nível de líquido num tubo de espécimes de urina não estiver entre as duas linhas pretas indicadoras do rótulo, o espécime tem de ser rejeitado. Não perfure um tubo demasiado cheio.
   d. Se um tubo de espécimes de urina contiver precipitado, aqueça o espécime a 37 °C durante até 5 minutos. Se o precipitado não voltar a entrar em solução, certifique-se visualmente de que o precipitado não impede a distribuição do espécime.

Nota: *Caso os Passos 4a - c não sejam seguidos, pode haver descarga de líquido da tampa do tubo de espécimes.*

5. Caso pretenda testar espécimes com tampas convencionais (tampas não penetráveis), é necessário centrifugá-los por 5 minutos a 420 RCF (força centrífuga relativa) para levar todo o líquido para o fundo do tubo antes de o destapar. **Evite salpicos e contaminação cruzada.**
6. Nos suportes TTU, coloque TTU suficientes para acomodar os calibradores, controlos e espécimes.
7. Caso uma lista de trabalho seja desejada, crie-a neste ponto. Para instruções sobre a criação de uma lista de trabalho, consulte o *APTIMA Assay Software Operator's Manual (Manual do Operador do Software de Ensaio APTIMA)*.
8. Misture bem o wTCR GC. Utilizando a pipeta de repetição, adicione 100 µL a cada tubo de reacção.
9. **O primeiro tubo de reacção do ensaio tem de conter o controlo negativo e o segundo tubo de reacção tem de conter o controlo positivo.**
   a. O rótulo do controlo negativo para o ensaio APTIMA GC é cor-de-rosa. O texto do rótulo identifica o controlo negativo como "CONTROL + CT PCT / CONTROL – GC NGC". O rótulo do controlo positivo para o ensaio APTIMA GC é azul esverdeado. O texto do rótulo identifica o controlo positivo como "CONTROL + GC PGC / CONTROL – CT NCT".
   b. Segure o tubo de controlo negativo (tubo rotulado a rosa) na mão ou mantenha-o num suporte. Com a utilização de uma micropipeta, perfure a tampa, tomando cuidado para não chegar com a ponta ao fundo do tubo. Adicione 400 µL do controlo negativo (tubo rotulado a rosa) ao primeiro tubo de reacção. Da mesma forma, e utilizando uma nova ponta de pipeta, adicione 400 µL de controlo positivo (tubo rotulado a azul esverdeado) ao segundo tubo de reacção.

10. Continue o procedimento de preparação do suporte adicionando 400 µL de cada espécime aos tubos de reacção restantes. Utilize uma nova ponta de pipeta para cada espécime e controlo. O volume de espécime ou controlo aceitável para adição a um tubo de reacção é de 400 µL ± 100 µL. Consulte as secções *Notas ao procedimento* e *Pipetação de Controlos e Espécimenes* para mais informações.

Captura de Alvo (Target Capture)

A utilização do Sistema de Captura de Alvo GEN-PROBE é descrito no *Target Capture System Operator's Manual (Manual do Operador do Sistema de Captura de Alvo)*. Caso utilize o banho de calor seco/vórtex SB100 consulte a *SB100 Application Sheet (Ficha de aplicação SB100)*.

11. Cubra as TTU com cartões de selagem e agite o suporte manualmente com suavidade. **Não coloque os espécimes no vórtex.** Incube o suporte a 62 °C ± 1 °C, em banho de água, durante 30 ± 5 minutos.
12. Remova o suporte do banho de água e seque a parte inferior dos tubos com material absorvente.
13. Assegure-se de que os cartões de selagem estão bem colocados. Caso necessário, substitua-os com novos cartões de selagem e sele bem as TTU.
14. Agite o suporte no misturador vórtex multitubos durante 60 segundos. Consulte a secção *Notas ao procedimento*, *Utilização do vórtex* para mais informações. Comece a agitar nos 2 minutos que se seguem à retirada do suporte do banho de água.
15. Sem retirar os cartões de selagem, incube o suporte à temperatura ambiente durante 30 ± 5 minutos.
16. Coloque o suporte na base magnética da unidade TCS durante 5 a 10 minutos.
17. Prepare a linha da bomba da estação de fornecimento bombeando a Solução de Lavagem APTIMA através do distribuidor. Bombeie líquido bastante pelo sistema para que não haja bolhas de ar na linha e que todos os dez bocais forneçam um fluxo constante de líquido.
18. Ligue a bomba de vácuo e desconecte o distribuidor de aspiração do primeiro conector entre o distribuidor de aspiração e o frasco de apreensão. Assegure-se de que o manómetro de vácuo cumpre as especificações do teste de fuga.[1] Pode demorar 15 segundos a obter esta leitura. Reconecte o distribuidor de aspiração, e assegure-se de que o manómetro de vácuo cumpre as especificações do nível de vácuo. Deixe a bomba de vácuo ligada até que os passos de captura do alvo estejam concluídos e a tubagem de aspiração esteja seca.
19. Aplique firmemente o distribuidor de aspiração ao primeiro conjunto de pontas. Aspire todo o líquido baixando as pontas na primeira TTU até as pontas entrarem brevemente em contacto com as partes inferiores dos tubos. Não mantenha as pontas em contacto com as partes inferiores dos tubos.
20. Após ter terminado a aspiração, ejecte as pontas na TTC original. Repita os passos da aspiração para as TTU restantes, usando uma ponta dedicada para cada espécime.
21. Coloque o distribuidor sobre cada TTU e, utilizando a bomba da estação de distribuição, distribua 1,0 mL de solução de lavagem APTIMA por cada tubo da TTU.
22. Cubra os tubos com um cartão de selagem e retire o suporte da base magnética TCS. Coloque uma vez no misturador vórtex de multitubos. Consulte a secção *Notas ao procedimento*, *Utilização do vórtex* para mais informações.
23. Coloque o suporte na base magnética da unidade TCS durante 5 a 10 minutos.

1 Consulte a Ficha de Especificações de Vácuo do Sistema de Captura de Alvo, localizada na parte posterior do *Target Capture System Operator's Manual (Manual do Operador do Sistema de Captura de Alvo)* ou contacte o Suporte Técnico.

24. Aspire todo o líquido, como nos Passos 19 e 20.
25. Após a aspiração final, retire o suporte da base magnética da unidade TCS e inspeccione visualmente os tubos para garantir que todo o líquido foi aspirado e que todos os tubos contêm pellets de partículas magnéticas. Caso seja visível algum líquido, volte a colocar o suporte na base magnética da unidade TCS durante 2 minutos e repita a aspiração nessa TTU, utilizando as mesmas pontas que utilizou anteriormente para cada espécime.

Nota: *Se for visível qualquer grânulo de partícula magnética após ter terminado a aspiração, o tubo pode ser aceite. Se não for visível qualquer grânulo, o espécime deve ser testado novamente. Se o mesmo espécime não contiver um grânulo de partícula magnética neste passo num teste posterior, isto poderá ser indicação de que existe um problema específico do espécime. Nesta situação, recomenda-se uma nova colheita de espécimes.*

D. Amplificação

Caso utilize o banho de calor seco/vórtex SB100 consulte a *SB100 Application Sheet (Ficha de aplicação SB100)*.

1. Utilizando a pipeta de repetição, adicione 75 µL do reagente de amplificação GC reconstituído a cada tubo de reacção. Todas as misturas de reacção no suporte deverão estar de cor vermelha.
2. Utilizando a pipeta de repetição, adicione 200 µL do reagente a óleo a cada tubo de reacção.
3. Cubra os tubos com um cartão de selagem e leve ao misturador vórtex multitubos.
4. Incube o suporte num banho de água a 62 °C ± 1 °C durante 10 ± 5 minutos.
5. Transfira o suporte para um banho de água a 42 °C ± 1 °C e incube durante 5 ± 2 minutos.
6. Com o suporte no banho de água, remova cuidadosamente o cartão de selagem e, utilizando a pipeta de repetição, adicione 25 µL do reagente enzimático reconstituído a cada tubo de reacção. Todas as reacções deverão agora ter a cor laranja.
7. Cubra imediatamente os tubos com um cartão de selagem novo, retire o suporte do banho de água e misture os tubos de reacção agitando suavemente o suporte manualmente.
8. Incube o suporte num banho de água a 42 °C ± 1 °C durante 60 ± 15 minutos.

E. Ensaio de protecção da hibridação (Hybridization Protection Assay, HPA)

Caso utilize o banho de calor seco/vórtex SB100 consulte a *SB100 Application Sheet (Ficha de aplicação SB100)*.

A pipeta de repetição usada nos passos de hibridização e selecção deve ser dedicada para utilização somente nestes passos. Consulte a secção *Avisos e precauções*.

1. Hibridação
   a. Retire o suporte do banho de água e transfira-o para a área de HPA. Utilizando a pipeta de repetição, adicione 100 µL do reagente de sonda GC reconstituído a cada tubo de reacção. Todas as reacções deverão agora ter a cor amarela.
   b. Cubra os tubos com um cartão de selagem e leve ao misturador vórtex multitubos.
   c. Incube o suporte num banho de água a 62 °C ± 1 °C durante 20 ± 5 minutos.
   d. Retire o suporte do banho de água e incube-o à temperatura ambiente durante 5 ± 1 minutos.

2. Selecção
   a. Utilizando a pipeta de repetição, adicione 250 µL do reagente de selecção a cada tubo de reacção. Todas as reacções deverão agora ter a cor vermelha.
   b. Cubra os tubos com um cartão de selagem, misture o suporte no vórtex durante 10 segundos ou até a cor ser uniforme, e incube o suporte em banho de água a 62 °C ± 1 °C durante 10 ± 1 minutos.
   c. Retire o suporte do banho de água.
3. Detecção

   A detecção tem de ser realizada entre 18 °C e 28 °C.

   a. Incube o suporte entre 18 °C e 28 °C durante 15 ± 3 minutos.

Nota: *Este intervalo de temperatura é crítico para o desempenho do ensaio.*

   b. Para utilização do LEADER HC+ Luminómetro e o software de ensaio APTIMA, consulte o *LEADER HC+ Luminometer Operator's Manual (Manual do Operador LEADER HC+ Luminómetro)* e o *APTIMA Assay Software Operator's Manual (Manual do Operador do Software de Ensaio APTIMA).*
   c. Assegure-se de que existem volumes suficientes de Auto Detect 1 e 2 para completar os testes.
   d. Prepare o LEADER HC+ Luminómetro colocando uma TTU vazia na posição 1 da cassete e execute o protocolo **Wash (lavagem)**.
   e. Carregue as TTU no luminómetro.
   f. Inicie sessão no computador. Clique em **New Run (Novo teste)**, escolha **APTIMA GC Assay Protocol (Protocolo do ensaio APTIMA GC)** e introduza o número de tubos (controlos e espécimes). Clique em **Next (Seguinte)** para iniciar a execução.

Nota: *O teste deve ser terminado num período de 2 horas a partir do final da incubação do passo de selecção.*

   g. Prepare o fluido de desactivação misturando volumes iguais de solução de hipoclorito de sódio 5% a 7% (0,7 M a 1,0 M) e tampão para fluido de desactivação APTIMA num recipiente de plástico com tampa grande. Coloque a etiqueta e escreva a data de validade no recipiente de plástico. O Fluido de Desactivação fica estável durante 4 semanas à temperatura ambiente. Elimine o Fluido de Desactivação após 4 semanas ou após 100 amostras processadas terem sido desactivadas (o que vier primeiro).
   h. Após remover as TTU usadas do luminómetro, coloque-as no recipiente de Fluido de Desactivação. Deixe que as TTU estabilizem no recipiente durante, pelo menos, 15 minutos, antes de serem eliminadas. Métodos apropriados para manuseamento e descarte devem ser estabelecidos pelo director do laboratório.

Notas ao procedimento

A. Controlos

Para trabalhar correctamente com o software do ensaio APTIMA, o controlo negativo para GC, rotulado "CONTROL + CT PCT / CONTROL – GC NGC," tem de estar na primeira posição da primeira TTU. O controlo positivo para GC, rotulado "CONTROL + GC PGC / CONTROL – CT NCT," tem de estar na segunda posição da primeira TTU. A colocação na posição errada causará a falha do teste. Quaisquer controlos adicionais deverão ser digitados como espécimes de pacientes e monitorados pelo operador para aceitabilidade. O controlo positivo para CT funciona como controlo negativo para o ensaio APTIMA GC.

B. Pipetação de Controlos e Espécimenes

O volume de controlo ou espécime adicionado ao tubo de reacção deve ser de 400 µL ± 100 µL. Recomenda-se a inspecção visual do volume pipetado para o tubo de reacção para assegurar uma transferência adequada do volume. É necessário um volume adequado de espécime ou controlo para fornecer resultados precisos. Se não tiver sido pipetado o volume adequado, volte a pipetar o wTCR GC e o controlo ou espécime para num novo tubo de reacção.

C. Reagentes

A Solução de Reconstituição de Sonda pode precipitar durante o armazenamento. Caso isto ocorra, aqueça a solução de reconstituição da sonda a 62 °C durante 1 a 2 minutos. Após este passo de aquecimento, o Reagente de Reconstituição de Sonda pode ser usado mesmo se ainda houver precipitado residual. Após a nova suspensão, misture o frasco invertendo suavemente, com cuidado para não induzir a formação de espuma.

D. Temperatura

1. Os passos de captura de alvo, amplificação, hibridização e selecção dependem da temperatura. Assim, torna-se imperativo que os banhos de água sejam mantidos nos intervalos de temperatura especificados.
2. Considera-se que a temperatura ambiente é a compreendida entre 15 °C e 30 °C.
3. Os passos de detecção do ensaio têm de ser realizados a uma temperatura entre 18 °C e 28 °C.

E. Tempo

Os passos de captura de alvo, amplificação, hibridização e selecção dependem do tempo. Cumpra os tempos especificados no *Procedimento de Teste dos Sistemas DTS.*

F. Utilização do vórtex

É importante que a mistura no vórtex seja bem feita para que o ensaio APTIMA GC seja bem-sucedido. Quando se atinge um movimento de vórtex adequado, a suspensão gira a uma velocidade que eleva a solução para a parte superior do tubo. Esta manipulação (vórtex) é mantida por períodos de tempo específicos. Para fazer o vórtex de reacções, defina a velocidade de misturador do vórtex multitubos para a posição mais baixa, fixe o suporte e ligue a corrente eléctrica. Aumente a velocidade lentamente até que o líquido suba até metade do tubo. Sujeite ao vórtex durante 10 segundos, durante o tempo indicado ou até a cor ficar uniforme. De seguida, rode a velocidade para o mínimo antes de desligar o misturador vortéx multitubos e retirar o suporte. As misturas de reacção não devem nunca tocar nos cartões de selagem.

G. Banhos de Água

1. O nível da água nos banhos de água tem de ser mantido a uma profundidade de 1,5 polegadas a 2,0 polegadas (3,8 cm a 5 cm), medidas desde o tabuleiro de metal de suporte (no fundo do banho de água) até à superfície da água. Assim ficará assegurada uma transferência de calor adequada.
2. Para evitar contaminação cruzada, os banhos de água devem ser dedicados para um passo específico do ensaio.

H. Descontaminação

1. Superfícies e pipetas

   As superfícies das bancadas do laboratório e as pipetas têm de ser regularmente descontaminadas com solução de hipoclorito de sódio de 2,5% a 3,5% (0,35 M a 0,5 M). Deixe a solução de hipoclorito de sódio em contacto com as superfícies durante pelo menos 1 minuto, enxaguando-as depois com água. Não deixe secar a solução de hipoclorito de sódio. As soluções com cloretos podem provocar corrosão nos equipamentos e metais. Enxagúe bem o equipamento com água para evitar a corrosão.

2. Distribuidor de Aspiração TCS
   a. Coloque um TTC novo no suporte de TTC. Active a bomba de vácuo. Aplique o distribuidor de aspiração às pontas no TTC. Aspire toda a Solução de Lavagem restante na malga de preparação da estação de distribuição de Solução de Lavagem. (Tire o distribuidor do caminho.)
   b. Coloque pelo menos 100 mL de solução de hipoclorito sódio entre 0,5% a 0,7% (0,07 M a 0,1 M), ou, se preferir, 2,5% a 3,5% (0,35 M a 0,5 M), na malga de preparação. Aspire toda a solução com o distribuidor de aspiração.
   c. Coloque pelo menos 100 mL de água desionizada na malga de preparação. Aspire toda a água com o distribuidor de aspiração.
   d. Ejecte as pontas no TTC original.
   e. Deixe a bomba de vácuo ligada até que o distribuidor esteja seco para evitar o refluxo.
   f. Descontamine as superfícies do distribuidor de aspiração da forma descrita na *Unidade TCS*.

3. Recipiente de resíduos TCS

   Quando o frasco de resíduos estiver 25% cheio, ou semanalmente, remova o frasco de resíduos do Sistema de Captura de Alvo.
   a. Desligue a bomba de vácuo e permita que a pressão do vácuo seja equalizada.
   b. Libere os encaixes de desconexão rápida entre o frasco de resíduos e o frasco de recolha de líquido, e o frasco de resíduos e o distribuidor de aspiração.
   c. Remova o frasco de resíduos do compartimento de apreensão de vácuo.
   d. Retire a tampa e adicione cuidadosamente 400 mL de solução de hipoclorito de sódio 5% a 7% (0,7 M a 1,0 M) ao frasco (ou 1 L se estiver a utilizar um frasco de resíduos de 10 L).

      Nota: *Isto pode ser feito numa cobertura de vapores para evitar o escape de vapores no laboratório.*
   e. Tape o frasco de resíduos e agite gentilmente o conteúdo até que se misturem completamente.
   f. Deixe o frasco de resíduos repousar por 15 minutos e então elimine o conteúdo (resíduos).
   g. Enxagúe o frasco de resíduos com água para remover qualquer resíduo restante.
   h. Tape o frasco de resíduos vazio e coloque-o no compartimento de apreensão de vácuo. Aplique os encaixes de desconexão rápida à unidade TCS. Elimine cuidadosamente ambas as luvas.

4. Unidade TCS

   Limpe as superfícies da unidade TCR, do distribuidor de aspiração e das pontas do ejector do tampão de lavagem com toalhetes de papel humedecidos em solução de hipoclorito de sódio de 2,5% a 3,5% (0,35 M a 0,5 M). Após o passo de limpeza com hipoclorito de sódio, enxague com água e, em seguida, seque totalmente as superfícies com toalhetes de papel.

5. Suportes

   Mergulhe os suportes em solução de hipoclorito de sódio 2,5% a 3,5% (0,35 M a 0,5 M), assegurando que ficam cobertos pela solução de hipoclorito de sódio. Mantenha os suportes mergulhados por 10 minutos. Uma exposição mais prolongada danificará os suportes. Lave bem os suportes com água, coloque-os sobre uma superfície absorvente limpa, e permita que os suportes sequem ao ar completamente. Para prolongar a vida útil dos suportes, permita que eles sequem em posição erecta e não de cabeça para baixo.

I. Contaminação do Ensaio

1. A introdução de materiais contaminantes pode ocorrer se não for tido o cuidado suficiente durante o protocolo de ensaio.
2. As TTU têm de ser descontaminadas com fluido de desactivação conforme descrito em *Detecção*. Não volte a utilizar as TTU.
3. Realize regularmente uma descontaminação do equipamento e das superfícies de trabalho conforme descrito na secção *Notas ao procedimento*, *Descontaminação*.
4. Como em qualquer sistema de reagente, o excesso de pó em algumas luvas pode causar a contaminação de tubos abertos. É recomendada a utilização de luvas sem pó.

J. Protocolo de Monitorização de Contaminação Laboratorial para Sistemas DTS

Existem muitos factores específicos do laboratório que podem contribuir para a contaminação, incluindo volume de testes, fluxo de trabalho, predomínio de doenças e várias outras actividades laboratoriais. Esses factores devem ser considerados ao estabelecer-se a frequência da monitorização de contaminação. Os intervalos para a monitorização de contaminação devem ser estabelecidos com base nas práticas e procedimentos de cada laboratório.

Para monitorizar a contaminação laboratorial, o seguinte procedimento deve ser executado usando o Kit Unissexo APTIMA de Colheita de Espécimes de Esfregaço para Espécimes de Esfregaço Endocervical e da Uretra Masculina:

1. Etiquete os tubos de transporte dos esfregaços com números correspondentes às áreas a serem testadas.
2. Remova o esfregaço de colheita de espécimesnes (esfregaço com haste azul e impressão verde) de sua embalagem, humedeça-o no meio para transporte de esfregaço, e esfregue a área designada com um movimento circular.
3. Introduza imediatamente a zaragatoa num tubo de transporte.
4. Quebre com cuidado a haste da zaragatoa na linha marcada, tendo o cuidado de evitar que o conteúdo salpique.
5. Tape novamente o tubo de transporte de esfregaços bem apertado.
6. Repita os Passos 2 a 5 em cada área a amostrar com a zaragatoa.
7. Teste o esfregaço utilizando o ensaio APTIMA GC de acordo com o *Procedimento de Teste dos Sistemas DTS.*

Se os resultados forem positivos ou equívocos para GC (consulte *Interpretação do teste - controlo de qualidade/resultados do paciente*), a superfície pode estar

contaminada e deve ser descontaminada tratando-a com uma solução de hipoclorito de sódio, tal como recomendado no *Procedimento de Teste dos Sistemas DTS*, *Preparação do Equipamento*.

Nota: *Caso se suspeite de contaminação do banho de água, este pode ser testado utilizando o procedimento de teste para espécimes de urina, adicionando 2,0 mL de água a um tubo de transporte de espécimes de urina.*

K. Resolução de Problemas

1. Valores de controlo positivo baixos podem ser causados por temperaturas incorrectas durante vários passos no ensaio ou ao permitir que o tempo de selecção no passo de selecção dure mais do que o recomendado.
2. Antecedentes altos podem ocorrer se o tempo de selecção no passo de selecção for abreviado, a temperatura de selecção não estiver correcta ou ocorrer mistura insuficiente após adicionar o Reagente de selecção.
3. Se o controlo negativo para GC APTIMA, rotulado “CONTROL + CT PCT / CONTROL – GC NGC”, for positivo ou equívoco para GC, consulte *Notas ao procedimento, Contaminação do Ensaio* para mais informações.

Sistema TIGRIS DTS

Os reagentes do ensaio APTIMA GC são indicados abaixo para os Sistema TIGRIS DTS. Os Símbolos para Identificação dos Reagentes também são listados junto ao nome do reagente.

Reagentes e materiais fornecidos

Kit do ensaio APTIMA Neisseria gonorrhoeae

100 testes (2 caixas e 1 kit de controlos) (Ref.ª Cat. 303092)

2 x 50 testes (2 caixas e 1 kit de controlos) (Ref.ª Cat. 302225)

Ensaio APTIMA Neisseria gonorrhoeae Caixa refrigerada (Embalagem 1 de 2) (armazenar entre 2 °C e 8 °C após recepção)

Símbolo	Componente	Quantidade	
		kit de 100 testes	**kit 2 x 50 testes**
A	**Reagente de amplificação APTIMA para GC** *Ácidos nucleicos não infecciosos secos em solução tamponada contendo < 5% de agente de volume.*	1 frasco	2 frascos
E	**Reagente enzimático APTIMA** *Transcriptase reversa e RNA polimerase secos em solução tamponada HEPES contendo < 10% de reagente de volume.*	1 frasco	2 frascos
P	**Reagente de sonda APTIMA para GC** *Sondas de DNA quimioluminescentes não-infecciosas secas em solução tamponada com succinato contendo < 5% de detergente.*	1 frasco	2 frascos
TCR-B	**Reagente de captura do alvo B APTIMA** *Ácido nucleico não infeccioso em solução tamponada contendo < 5% de detergente.*	1 x 0,30 mL	2 x 0,143 mL
	Colarinho de Reconstituição		6

Ensaio APTIMA Neisseria gonorrhoeae Caixa de temperatura ambiente (Embalagem 2 de 2) (armazenar entre 15 °C e 30 °C após recepção)

Símbolo	Componente	Quantidade	
		kit de 100 testes	**kit 2 x 50 testes**
AR	**Solução de reconstituição de amplificação APTIMA para GC** *Solução aquosa contendo conservantes.*	1 x 11,9 mL	2 x 6,4 mL
ER	**Solução de reconstituição para reagente enzimático APTIMA** *Solução tampão HEPES contendo um surfactante e glicerol.*	1 x 6,3 mL	2 x 3,3 mL

Ensaio APTIMA Neisseria gonorrhoeae Caixa de temperatura ambiente (Embalagem 2 de 2) (armazenar entre 15 °C e 30 °C após recepção)

Símbolo	Componente	Quantidade	
		kit de 100 testes	kit 2 x 50 testes
PR	**Solução de reconstituição de sonda APTIMA para GC** *Solução tamponada de succinato contendo < 5% de detergente.*	1 x 15,2 mL	2 x 7,7 mL
S	**Reagente de selecção APTIMA** *Solução tamponada com borato a 600 mM contendo surfactante.*	1 x 43,0 mL	2 x 20 mL
TCR	**Reagente de captura do alvo APTIMA para GC** *Solução tamponada salina contendo fase sólida e oligómeros de captura.*	1 x 26,0 mL	2 x 17 mL
	Colarinho de Reconstituição	3	
	Pipetas de transferência		2
	Folha de código de barras do lote principal	1 folha	1 folha

Kit de controlos APTIMA (armazenar entre 2 °C e 8 °C após recepção)

Símbolo	Componente	Quantidade
PGC/ NCT	**Controlo Positivo APTIMA, GC / Controlo Negativo, CT** *Ácido nucleico de GC não infeccioso em solução tamponada contendo < 5% de detergente. Cada amostra de 400 µL contém rRNA que se estima ser equivalente a 50 células de GC (250 fg/ensaio*).*	5 x 1,7 mL
PCT/ NGC	**Controlo Positivo APTIMA, CT / Controlo Negativo, GC** *Ácido nucleico de CT não infeccioso em solução tamponada contendo < 5% de detergente. Cada amostra de 400 µL contém rRNA que se estima ser equivalente a 1 unidade formadora de inclusões (inclusion forming unit, IFU) de CT (5 fg/ensaio*).*	5 x 1,7 mL

*Os equivalentes rRNA foram calculados com base no tamanho do genoma e a taxa estimada média/célula DNA:RNA de cada organismo.

Materiais necessários, mas disponíveis separadamente

Nota: *Excepto indicação em contrário, as referências de catálogo dos materiais disponibilizados pela Gen-Probe são mencionadas.*

	Ref.ª Cat.
Sistema TIGRIS DTS	105118
Kit de fluidos do ensaio APTIMA *(solução de lavagem APTIMA, tampão para o fluido de desactivação APTIMA e reagente a óleo APTIMA)*	302382
Kit de auto-detecção APTIMA	301048
Kit de conservantes dos fluidos do ensaio APTIMA	302380
Pontas, 1.000 µL, condutoras, com sensores de líquido	10612513 (Tecan)

		Ref.ª Cat.
Kit de execução do Sistema TIGRIS DTS contendo		301191
Unidades multitubos (Multi-tube Units, MTU)	*104772-02*	
Kit de saco de pontas usadas de MTU	*900907*	
Deflectores do recipiente de resíduos de MTU	*900931*	
Tampas do recipiente de resíduos de MTU	*105523*	
Kit de transferência de espécimes APTIMA *para utilização com espécimes em solução PreservCyt*		301154C
Kit APTIMA de colheita de esfregaços vaginais		301162
Kit Unissexo APTIMA de Colheita de Espécimes de Esfregaço para Espécimes de Esfregaço Endocervical e da Uretra Masculina		301041
Kit APTIMA de colheita de espécimes de urina para espécimes de urina masculinos e femininos		301040
Tubos de transporte APTIMA para espécimes de urina para espécimes de urina masculinos e femininos		105575
Lixívia, solução de hipoclorito de sódio 5% a 7% (0,7 M a 1,0 M)		—
Água para o Sistema TIGRIS DTS *consulte o TIGRIS DTS System Operator's Manual (Manual do Operador do Sistema TIGRIS DTS) para obter as especificações*		—
Luvas descartáveis		—
Padrão de calibração SysCheck		301078
Tampas penetráveis APTIMA		105668
Tampas não-penetráveis de substituição		103036A
Tampas suplentes para os kits de 100 testes		—
Soluções de reconstituição para os reagentes de amplificação, enzimático e de sonda	*CL0041 (100 tampas)*	
TCR e reagente de selecção	*501604 (100 tampas)*	
Tampas suplentes para os kits de 50 testes		—
Soluções de reconstituição para os reagentes de amplificação, enzimático e de sonda	*501603 (100 tampas)*	
TCR e reagente de selecção	*501604 (100 tampas)*	

Materiais Opcionais

	Ref.ª Cat.
Kit de controlos APTIMA	301110
Reforço de lixívia GEN-PROBE *para a limpeza de rotina de superfícies e equipamento*	302101

Procedimento de Teste do Sistema TIGRIS DTS

Nota: *Consulte o TIGRIS DTS System Operator's Manual (Manual do Operador do Sistema TIGRIS DTS) para mais informações sobre procedimentos do Sistema TIGRIS DTS.*

A. Preparação da área de trabalho

Limpe as superfícies de trabalho onde os reagentes e amostras serão preparados. Limpe as superfícies de trabalho com solução de hipoclorito de sódio de 2,5% a 3,5% (0,35 M a 0,5 M). Deixe a solução de hipoclorito de sódio em contacto com as superfícies durante pelo menos 1 minuto, enxaguando-as depois com água. Não deixe secar a solução de hipoclorito de sódio. Cubra a superfície da bancada onde os reagentes e as amostras serão preparados com capas absorventes para bancadas de laboratórios com forro plástico.

B. Reconstituição dos reagentes/Preparação de um novo kit

Nota: *A reconstituição dos reagentes deve ser realizada antes de começar qualquer trabalho no Sistema TIGRIS DTS.*

1. Para reconstituir os reagentes de amplificação GC, enzimático e de sonda GC, para os kits de 100 testes e de 50 testes, combine os frascos de reagente liofilizado com a solução de reconstituição. Se estiverem refrigeradas, deixe as soluções de reconstituição alcançar a temperatura ambiente antes de serem utilizadas.
   a. Emparelhe cada solução de reconstituição com seu reagente liofilizado. Certifique-se de que a solução de reconstituição e o reagente liofilizado tenham cores de etiqueta correspondentes antes de aplicar o colarinho de reconstituição.
   b. Verifique os números do lote na Ficha de Código de Barras do Lote Principal para garantir que os reagentes adequados sejam emparelhados.
   c. Abra o frasco de reagente liofilizado e insira com firmeza a extremidade ranhurada do colarinho de reconstituição na abertura do frasco (Figura 2, Passo 1).
   d. Abra o frasco da solução de reconstituição correspondente, e deposite a tampa sobre uma superfície de trabalho limpa e coberta.
   e. Enquanto segura o frasco da solução de reconstituição na bancada, insira firmemente a outra extremidade do colarinho de reconstituição na abertura do frasco (Figura 2, Passo 2).
   f. Inverta lentamente os frascos montados. Permita que a solução escoe do frasco de solução para o frasco de vidro (Figura 2, Passo 3).
   g. Agite suavemente a solução no frasco para misturar. Evite a criação de espuma enquanto agita o frasco (Figura 2, Passo 4).
   h. Aguarde que o reagente liofilizado entre em solução e depois inverta novamente os frascos montados, inclinando-o a um ângulo de 45° para minimizar a formação de espuma (Figura 2, Passo 5). Deixe todo o líquido escoar de volta para o frasco de plástico.
   i. Retirar o colarinho de reconstituição e o frasco de vidro (Figura 2, Passo 6).
   j. Volte a colocar a tampa no frasco.
      - No caso dos frascos de 50 testes, descole e elimine a etiqueta superior. Anote as iniciais do operador, a data de reconstituição e o número do lote do reagente liofilizado na etiqueta remanescente (Figura 2, Passo 7).
      - No caso dos frascos de 100 testes, anote as iniciais do operador e a data de reconstituição directamente na etiqueta (ver Figura 3).
   k. Elimine o colarinho de reconstituição e o frasco de vidro (Figura 2, Passo 8).

Aviso: *Evite formar espuma ao reconstituir os reagentes. A espuma compromete o sensor de nível no Sistema TIGRIS DTS.*

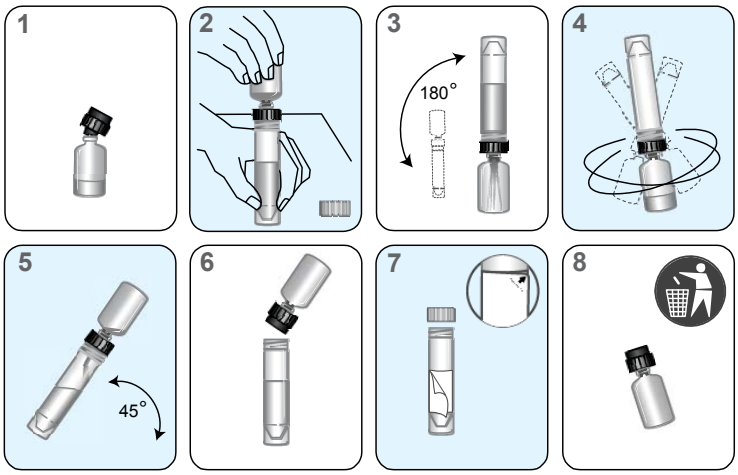

Figura 2. Processo de reconstituição nos Sistema TIGRIS DTS

2. Prepare o TCR GC de trabalho (wTCR GC) para o kit de 100 testes
   a. Emparelhe os frascos apropriados de TCR GC e TCR-B.
   b. Verifique os números do lote na Ficha de Código de Barras do Lote Principal para garantir que os reagentes adequados no kit estejam emparelhados.
   c. Abra o frasco de TCR GC e coloque a tampa numa superfície de trabalho limpa e coberta.
   d. Abra o frasco de TCR-B e verta todo o seu conteúdo para o frasco de TCR GC. Espere que uma pequena quantidade de líquido permaneça no frasco de TCR-B.
   e. Coloque a tampa no frasco de TCR GC e agite suavemente a solução para misturar os conteúdos. Evite formar espuma durante este passo.
   f. Anote as iniciais do operador e a data actual na etiqueta.
   g. Elimine o frasco e a tampa de TCR-B.
3. Prepare o TCR GC de trabalho (wTCR GC) para o kit de 50 testes
   a. Emparelhe os frascos apropriados de TCR GC e TCR-B.
   b. Verifique os números do lote na Ficha de Código de Barras do Lote Principal para garantir que os reagentes adequados no kit estejam emparelhados.
   c. Abra o frasco de TCR GC e coloque a tampa numa superfície de trabalho limpa e coberta.
   d. Abra o frasco de TCR-B e coloque a tampa numa superfície de trabalho limpa e coberta.
   e. Retire a pipeta de transferência da sua embalagem.
   f. Transfira aproximadamente 2 mL de TCR GC para o frasco de TCR-B. **Não** elimine a pipeta de transferência neste passo.
   g. Volte a colocar a tampa do frasco de TCR-B e misture por inversão.
   h. Transfira o wTCR GC do frasco de TCR-B de volta para o frasco de TCR GC.
   i. Repita o Passo h diversas vezes até que a mistura no frasco de TCR-B se transfira de volta para o frasco de TCR GC.

j. Coloque a tampa no frasco de TCR GC e agite suavemente a solução para misturar os conteúdos. Evite formar espuma durante este passo.

k. Registe as iniciais do operador e a data actual na etiqueta. Registe o número de lote de TCR-B.

l. Elimine o frasco e a tampa de TCR-B. Elimine a pipeta de transferência.

4. Prepare o reagente de selecção
   a. Verifique o número do lote no frasco de reagente para se certificar de que corresponde ao número de lote na folha de código de barras do lote principal.
   b. Registe as iniciais do operador e a data actual na etiqueta.

Nota: *Misture bem invertendo todos os reagentes antes de os carregar no sistema. Evite formar espuma durante a inversão dos reagentes.*

C. Preparação de reagentes para reagentes previamente reconstituídos
   1. Os reagentes de amplificação GC, enzimático e de sonda GC previamente reconstituídos têm de atingir a temperatura ambiente (15 °C a 30 °C) antes do início do ensaio.
   2. Se o reagente de sonda GC reconstituído contiver um precipitado que não volte a solubilizar-se à temperatura ambiente, aqueça o frasco tapado a uma temperatura que não superior a 62 °C durante 1 a 2 minutos. Após este passo de aquecimento, o reagente de sonda GC pode ser utilizado mesmo que reste algum precipitado residual. Misture o reagente de sonda GC por inversão, tendo o cuidado de não induzir a formação de espuma, antes de os carregar no sistema.
   3. Misture bem todos os reagentes, invertendo-os suavemente, antes de os carregar no sistema. Evite formar espuma durante a inversão dos reagentes.
   4. Não encha demasiado os frascos de reagentes. O sistema TIGRIS DTS reconhece e rejeita frascos que estejam demasiadamente cheios.

D. Manuseamento de espécimes
   1. Deixe que os espécimes e controlos alcancem a temperatura ambiente antes do processamento.
   2. **Não agite os espécimes no vórtex.**
   3. Confirme visualmente se todos os tubos de espécimes cumprem um dos seguintes critérios:
      a. Presença de uma única zaragatoa de colheita azul APTIMA num tubo de transporte de esfregaços unissexo.
      b. Presença de uma única zaragatoa de colheita cor-de-rosa APTIMA num tubo de transporte de esfregaços vaginais.
      c. Volume final de urina entre as linhas de enchimento pretas dos tubos de transporte de espécimes de urina.
      d. Ausência de zaragatoa no tubo de transporte de espécimes APTIMA para espécimes citológicos em base líquida PreservCyt.
   4. Inspeccione os tubos de espécimes antes de os carregar no suporte:
      a. Caso um tubo de espécime contenha bolhas no espaço entre o líquido e a tampa, centrifugue o tubo por 5 minutos a 420 RCF para eliminar as bolhas.
      b. Caso um tubo de espécime apresente um volume menor do que o habitualmente observado quando se seguem as instruções de colheita, centrifugue o tubo por 5 minutos a 420 RCF para garantir que o líquido não fique retido na tampa.

c. Se o nível de líquido num tubo de espécimes de urina não estiver entre as duas linhas pretas indicadoras do rótulo, o espécime tem de ser rejeitado. Não perfure um tubo demasiado cheio.

d. Se um tubo de espécimes de urina contiver precipitado, aqueça o espécime a 37 °C durante até 5 minutos. Se o precipitado não voltar a entrar em solução, certifique-se visualmente de que o precipitado não impede a distribuição do espécime.

Nota: *Caso os Passos 4a - c não sejam seguidos, pode haver descarga de líquido da tampa do tubo de espécimes.*

Nota: *Podem ser testadas até 3 alíquotas distintas de cada tubo de espécimes. A tentativa de pipetar mais de 3 alíquotas do tubo de espécimes pode provocar erros por volume insuficiente.*

E. Preparação do sistema

Defina o sistema e a lista de trabalho de acordo com as instruções do *TIGRIS DTS System Operator's Manual (Manual do Operador do Sistema TIGRIS DTS)* e das *Notas ao procedimento*.

Notas ao procedimento

A. Controlos

1. Para trabalhar adequadamente com o software de Ensaio APTIMA para o Sistema TIGRIS DTS, são necessários controlos frontais e finais. O Controlo Positivo, CT / Controlo Negativo, GC deve ocupar a primeira posição e a penúltima posição de uma lista de trabalho. A etiqueta deste controlo é cor-de-rosa. O texto da etiqueta é "CONTROL + CT PCT / CONTROL – GC NGC". O Controlo Positivo, GC / Controlo Negativo, CT deve ocupar a segunda posição e a última posição de uma lista de trabalho. A etiqueta deste controlo é azul esverdeada. O texto da etiqueta é "CONTROL + GC PGC / CONTROL – CT NCT".
2. Cada tubo de controlo APTIMA pode ser testado uma vez. A tentativa de pipetar mais de uma vez do tubo de espécimes pode provocar erros por volume insuficiente.

B. Temperatura

Considera-se que a temperatura ambiente é a compreendida entre 15 °C e 30 °C.

C. Pó das Luvas

Como em qualquer sistema de reagente, o excesso de pó em algumas luvas pode causar a contaminação de tubos abertos. É recomendada a utilização de luvas sem pó.

D. Protocolo de Monitorização de Contaminação Laboratorial para o Sistema TIGRIS DTS

Existem muitos factores específicos do laboratório que podem contribuir para a contaminação, incluindo volume de testes, fluxo de trabalho, predomínio de doenças e várias outras actividades laboratoriais. Esses factores devem ser considerados ao estabelecer-se a frequência da monitorização de contaminação. Os intervalos para a monitorização de contaminação devem ser estabelecidos com base nas práticas e procedimentos de cada laboratório.

Para monitorizar a contaminação laboratorial, o seguinte procedimento deve ser executado usando o Kit Unissexo APTIMA de Colheita de Espécimes de Esfregaço para Espécimes de Esfregaço Endocervical e da Uretra Masculina:

1. Etiquete os tubos de transporte dos esfregaços com números correspondentes às áreas a serem testadas.

2. Remova o esfregaço de colheita de espécimesnes (esfregaço com haste azul e impressão verde) de sua embalagem, humedeça-o no meio para transporte de esfregaço, e esfregue a área designada com um movimento circular.
3. Introduza imediatamente a zaragatoa num tubo de transporte.
4. Quebre com cuidado a haste da zaragatoa na linha marcada, tendo o cuidado de evitar que o conteúdo salpique.
5. Tape novamente o tubo de transporte de esfregaços bem apertado.
6. Repita os Passos 2 a 5 em cada área a amostrar com a zaragatoa.

Caso os resultados para GC sejam positivos ou equívocos, consulte *Interpretação do teste - controlo de qualidade/resultados do paciente*. Para obter mais informações de monitorização de contaminações específicas para o sistema TIGRIS DTS, consulte o *TIGRIS DTS System Operator's Manual (Manual do Operador do Sistema TIGRIS DTS)*.

Sistema PANTHER

Os reagentes do ensaio APTIMA GC são indicados abaixo para os Sistema PANTHER. Os Símbolos para Identificação dos Reagentes também são listados junto ao nome do reagente.

Reagentes e materiais fornecidos

Kit do ensaio APTIMA Neisseria gonorrhoeae, 100 testes (2 caixas e 1 kit de controlos) (Ref.ª Cat. 302927)

Caixa refrigerada do ensaio APTIMA Neisseria gonorrhoeae (Caixa 1 de 2) (armazenar entre 2 °C e 8 °C após recepção)

Símbolo	Componente	Quantidade
A	**Reagente de amplificação APTIMA para GC** *Ácidos nucleicos não infecciosos secos em solução tamponada contendo < 5% de agente de volume.*	1 frasco
E	**Reagente enzimático GC APTIMA** *Transcriptase reversa e RNA polimerase secos em solução tamponada HEPES contendo < 10% de reagente de volume.*	1 frasco
P	**Reagente de sonda APTIMA para GC** *Sondas de DNA quimioluminescentes não-infecciosas secas em solução tamponada com succinato contendo < 5% de detergente.*	1 frasco
TCR-B	**Reagente B de captura do alvo GC APTIMA** *Ácidos nucleicos não-infecciosos numa solução tampão contendo < 5% de detergente.*	1 x 0,30 mL

Caixa APTIMA Neisseria gonorrhoeae de temperatura ambiente (Caixa 2 de 2) (armazenar entre 15 °C e 30 °C após recepção)

Símbolo	Componente	Quantidade
AR	**Solução de reconstituição de amplificação APTIMA para GC** *Solução aquosa contendo conservantes.*	1 x 11,9 mL
ER	**Solução de reconstituição para reagente enzimático GC APTIMA** *Solução tampão HEPES contendo um surfactante e glicerol.*	1 x 6,3 mL
PR	**Solução de reconstituição de sonda APTIMA para GC** *Solução tamponada de succinato contendo < 5% de detergente.*	1 x 15,2 mL
S	**Reagente de selecção GC APTIMA** *Solução tamponada com borato a 600 mM contendo surfactante.*	1 x 43,0 mL
TCR	**Reagente de captura do alvo APTIMA para GC** *Solução tamponada salina contendo fase sólida e oligómeros de captura.*	1 x 26,0 mL
	Colarinho de Reconstituição	3
	Folha de código de barras do lote principal	1 folha

Kit de controlos APTIMA
(armazenar entre 2 °C e 8 °C após recepção)

Símbolo	Componente	Quantidade
PGC/ NCT	**Controlo Positivo APTIMA, GC / Controlo Negativo, CT** *Ácido nucleico de GC não infeccioso em solução tamponada contendo < 5% de detergente. Cada amostra de 400 µL contém rRNA que se estima ser equivalente a 50 células de GC (250 fg/ensaio*).*	5 x 1,7 mL
PCT/ NGC	**Controlo positivo, CT/controlo negativo, GC APTIMA** *Ácido nucleico de CT não infeccioso em solução tamponada contendo < 5% de detergente. Cada amostra de 400 µL contém rRNA que se estima ser equivalente a 1 unidade formadora de inclusões (inclusion forming unit, IFU) de CT (5 fg/ensaio*).*	5 x 1,7 mL

*Os equivalentes rRNA foram calculados com base no tamanho do genoma e a taxa estimada média/célula DNA:RNA de cada organismo.

Materiais necessários, mas disponíveis separadamente

Nota: *Excepto indicação em contrário, as referências de catálogo dos materiais disponibilizados pela Gen-Probe são mencionadas.*

	Ref.ª Cat.
Sistema PANTHER	303095
Kit de fluidos do ensaio APTIMA *(solução de lavagem APTIMA, tampão para o fluido de desactivação APTIMA e reagente a óleo APTIMA)*	303014 (1.000 testes)
Kit de auto-detecção APTIMA	303013 (1.000 testes)
Unidades multitubos (Multi-tube Units, MTU)	104772-02
Kit de sacos de resíduos PANTHER	902731
Tampa do recipiente de resíduos do PANTHER	902714
Ou kit de teste PANTHER *contém MTU, sacos de resíduos, tampas de recipientes de resíduos, fluidos do ensaio e líquidos Auto Detect*	303096 (5.000 testes)
Pontas, 1.000 µL, condutoras, com sensores de líquido	10612513 (Tecan)
Kit de transferência de espécimes APTIMA *para utilização com espécimes em solução PreservCyt*	301154C
Kit APTIMA de colheita de esfregaços vaginais	301162
Kit Unissexo APTIMA de Colheita de Espécimes de Esfregaço para Espécimes de Esfregaço Endocervical e da Uretra Masculina	301041
Kit APTIMA de colheita de espécimes de urina para espécimes de urina masculinos e femininos	301040
Tubos de transporte APTIMA para espécimes de urina para espécimes de urina masculinos e femininos	105575
Lixívia, solução de hipoclorito de sódio 5% a 7% (0,7 M a 1,0 M)	—
Luvas descartáveis	—

Padrão de calibração SysCheck		301078
Tampas penetráveis APTIMA		105668
Tampas não-penetráveis de substituição		103036A
Tampas suplentes para os kits de 100 testes		—
Soluções de reconstituição para os reagentes de amplificação, enzimático e de sonda	*CL0041 (100 tampas)*	
TCR e reagente de selecção	*501604 (100 tampas)*	

Materiais Opcionais

	Ref.ª Cat.
Kit de controlos APTIMA	301110
Reforço de lixívia GEN-PROBE *para a limpeza de rotina de superfícies e equipamento*	302101

Procedimento de teste do Sistema PANTHER

Nota: *Consulte o PANTHER System Operator's Manual (Manual do Operador do Sistema PANTHER) para mais informações sobre procedimentos do Sistema PANTHER.*

A. Preparação da área de trabalho

1. Limpe as superfícies de trabalho onde os reagentes e amostras serão preparados. Limpe as superfícies de trabalho com solução de hipoclorito de sódio de 2,5% a 3,5% (0,35 M a 0,5 M). Deixe a solução de hipoclorito de sódio em contacto com as superfícies durante pelo menos 1 minuto, enxaguando-as depois com água. Não deixe secar a solução de hipoclorito de sódio. Cubra a superfície da bancada onde os reagentes e as amostras serão preparados com capas absorventes para bancadas de laboratórios com forro plástico.

B. Reconstituição dos reagentes/Preparação de um novo kit

Nota: *A reconstituição dos reagentes deve ser realizada antes de começar qualquer trabalho no Sistema PANTHER.*

1. Para reconstituir os reagentes de amplificação GC, enzimático GC e de sonda GC, combine os frascos de reagente liofilizado com a solução de reconstituição. Se estiverem refrigeradas, deixe que as soluções de reconstituição atinjam a temperatura ambiente antes de utilizá-las.
   a. Emparelhe cada solução de reconstituição com seu reagente liofilizado. Certifique-se de que a a solução de reconstituição e o reagente têm cores de etiqueta correspondentes antes de aplicar o colarinho de reconstituição.
   b. Verifique os números do lote na Ficha de Código de Barras do Lote Principal para garantir que os reagentes adequados sejam emparelhados.
   c. Abra o frasco de reagente liofilizado e insira com firmeza a extremidade ranhurada do colarinho de reconstituição na abertura do frasco (Figura 3, Passo 1).
   d. Abra a solução de reconstituição correspondente e coloque a tampa sobre uma superfície de trabalho limpa e coberta.
   e. Enquanto segura o frasco da solução de reconstituição na bancada, insira firmemente a outra extremidade do colarinho de reconstituição no frasco (Figura 3, Passo 2).

f. Inverta lentamente os frascos montados. Permita que a solução escoe do frasco de solução para o frasco de vidro (Figura 3, Passo 3).

g. Agite suavemente a solução no frasco para a misturar. Evite a criação de espuma durante a agitação do frasco (Figura 3, Passo 4).

h. Aguarde que o reagente liofilizado entre em solução e depois inverta novamente os frascos montados, inclinando-o a um ângulo de 45° para minimizar a formação de espuma (Figura 3, Passo 5). Deixe todo o líquido escoar de volta para o frasco de plástico.

i. Retire o colarinho de reconstituição e o frasco de vidro (Figura 3, Passo 6).

j. Coloque a tampa no frasco de plástico. Registe as iniciais do operador e a data de reconstituição no rótulo (Figura 3, Passo 7).

k. Elimine o colarinho e o frasco (Figura 3, Passo 8).

Aviso: *Evite formar espuma ao reconstituir os reagentes. A espuma compromete o sensor de nível no Sistema PANTHER.*

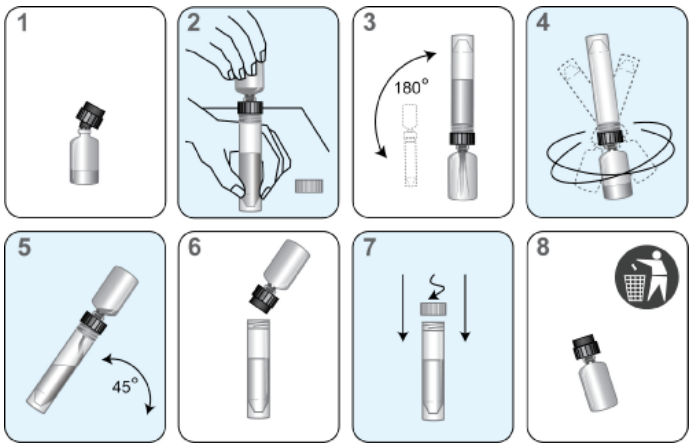

Figura 3. Processo de reconstituição no Sistema PANTHER

2. Prepare o reagente de captura do alvo de trabalho GC (Working Target Capture Reagent, wTCR GC)
   a. Emparelhe os frascos apropriados de TCR GC e TCR-B.
   b. Verifique os números do lote na Ficha de Código de Barras do Lote Principal para garantir que os reagentes adequados no kit estejam emparelhados.
   c. Abra o frasco de TCR GC e coloque a tampa numa superfície de trabalho limpa e coberta.
   d. Abra o frasco de TCR-B e verta todo o seu conteúdo para o frasco de TCR GC. Espere que uma pequena quantidade de líquido permaneça no frasco de TCR-B.
   e. Coloque a tampa no frasco de TCR GC e agite suavemente a solução para misturar os conteúdos. Evite formar espuma durante este passo.
   f. Registe as iniciais do operador e a data actual na etiqueta.
   g. Elimine o frasco e a tampa de TCR-B.
3. Prepare o reagente de selecção
   a. Verifique o número do lote no frasco de reagente para se certificar de que corresponde ao número de lote na folha de código de barras do lote principal.
   b. Registe as iniciais do operador e a data actual na etiqueta.

Nota: *Misture bem os reagentes de amplificação GC, enzimático GC, de sonda GC e de selecção GC invertendo-os suavemente antes de os carregar no sistema. Evite formar espuma durante a inversão dos reagentes.*

C. Preparação de reagentes para reagentes previamente reconstituídos

1. Os reagentes de amplificação, enzimático e de sonda previamente reconstituídos têm de atingir a temperatura ambiente (15 °C a 30 °C) antes do início do ensaio.
2. Se o reagente de sonda GC reconstituído contiver um precipitado que não volte a solubilizar-se à temperatura ambiente, aqueça o frasco tapado a uma temperatura que não superior a 62 °C durante 1 a 2 minutos. Após este passo de aquecimento, o reagente de sonda GC pode ser utilizado mesmo que reste algum precipitado residual. Misture o reagente de sonda GC por inversão, tendo o cuidado de não induzir a formação de espuma, antes de os carregar no sistema.
3. Misture bem todos os reagentes, invertendo-os suavemente, antes de os carregar no sistema. Evite formar espuma durante a inversão dos reagentes.
4. Não encha demasiado os frascos de reagentes. O Sistema PANTHER reconhece e rejeita frascos que estejam demasiadamente cheios.

D. Manuseamento de espécimes

1. Deixe que os espécimes e controlos alcancem a temperatura ambiente antes do processamento.
2. **Não agite os espécimes no vórtex.**
3. Confirme visualmente se todos os tubos de espécimes cumprem um dos seguintes critérios:
   a. Presença de uma única zaragatoa de colheita azul APTIMA num tubo de transporte de esfregaços unissexo.
   b. Presença de uma única zaragatoa de colheita cor-de-rosa APTIMA num tubo de transporte de esfregaços vaginais.
   c. Volume final de urina entre as linhas de enchimento pretas dos tubos de transporte de espécimes de urina.
   d. Ausência de zaragatoa no tubo de transporte de espécimes APTIMA para espécimes citológicos em base líquida PreservCyt.
4. Inspeccione os tubos de espécimes antes de os carregar no suporte:
   a. Caso um tubo de espécime contenha bolhas no espaço entre o líquido e a tampa, centrifugue o tubo por 5 minutos com 420 RCF para eliminar as bolhas.
   b. Caso um tubo de espécime apresente um volume menor do que o habitualmente observado quando se seguem as instruções de colheita, centrifugue o tubo por 5 minutos com 420 RCF para garantir que o líquido não fique retido na tampa.
   c. Se o nível de líquido num tubo de espécimes de urina não estiver entre as duas linhas pretas indicadoras do rótulo, o espécime tem de ser rejeitado. Não perfure um tubo demasiado cheio.
   d. Se um tubo de espécimes de urina contiver precipitado, aqueça o espécime a 37 °C durante até 5 minutos. Se o precipitado não voltar a entrar em solução, certifique-se visualmente de que o precipitado não impede a distribuição do espécime.

Nota: *Caso os Passos 4a - c não sejam seguidos, pode haver descarga de líquido da tampa do tubo de espécimes.*

Nota: *Podem ser testadas até 3 alíquotas distintas de cada tubo de espécimes. A tentativa de pipetar mais de 3 alíquotas do tubo de espécimes pode provocar erros de processamento.*

E. Preparação do sistema

1. Defina o sistema de acordo com as instruções do *PANTHER System Operator's Manual (Manual do Operador do Sistema PANTHER)* e das *Notas ao procedimento*. Certifique-se de que são utilizados suportes de reagente e adaptadores de TCR de dimensão adequada.
2. Carregue as amostras.

Notas ao procedimento

A. Controlos

1. Para funcionar correctamente com o software do ensaio APTIMA no Sistema PANTHER, é necessário um par de controlos. Os tubos de controlo positivo, CT / controlo negativo GC e de controlo positivo GC / controlo negativo CT podem ser carregados em qualquer posição do suporte ou em qualquer calha da zona de amostras do Sistema PANTHER. A pipetagem de espécimes do paciente começa quando se cumpre uma das duas condições seguintes:
   a. Está a ser actualmente processado pelo sistema um par de controlos.
   b. São registados no sistema resultados válidos para os controlos.
2. Depois de os tubos de controlo terem sido pipetados e estarem a ser processados para um kit de reagente específico, os espécimes dos pacientes podem ser testados com o kit de reagentes associado durante até 24 horas **excepto se:**
   a. Os controlos forem inválidos.
   b. O kit de reagente do ensaio associado for retirado do sistema.
   c. O kit de reagente do ensaio associado tiver excedido os limites de estabilidade.
3. Cada tubo de controlo APTIMA pode ser testado uma vez. A tentativa de pipetar mais de uma vez do tubo pode provocar erros de processamento.

B. Temperatura

Considera-se que a temperatura ambiente é a compreendida entre 15 °C e 30 °C.

C. Pó das Luvas

Como em qualquer sistema de reagente, o excesso de pó em algumas luvas pode causar a contaminação de tubos abertos. É recomendada a utilização de luvas sem pó.

D. Protocolo de monitorização de contaminação laboratorial para o Sistema PANTHER

Existem muitos factores específicos do laboratório que podem contribuir para a contaminação, incluindo volume de testes, fluxo de trabalho, predomínio de doenças e várias outras actividades laboratoriais. Esses factores devem ser considerados ao estabelecer-se a frequência da monitorização de contaminação. Os intervalos para a monitorização de contaminação devem ser estabelecidos com base nas práticas e procedimentos de cada laboratório.

Para monitorizar a contaminação laboratorial, o seguinte procedimento deve ser executado usando o Kit Unissexo APTIMA de Colheita de Espécimes de Esfregaço para Espécimes de Esfregaço Endocervical e da Uretra Masculina:

1. Etiquete os tubos de transporte dos esfregaços com números correspondentes às áreas a serem testadas.
2. Remova o esfregaço de colheita de espécimesnes (esfregaço com haste azul e impressão verde) de sua embalagem, humedeça-o no meio para transporte de esfregaço, e esfregue a área designada com um movimento circular.

3. Insira imediatamente o esfregaço no tubo de transporte.
4. Quebre com cuidado a haste da zaragatoa na linha marcada, tendo o cuidado de evitar que o conteúdo salpique.
5. Tape novamente o tubo de transporte de esfregaços bem apertado.
6. Repita os Passos 2 a 5 em cada área a amostrar com a zaragatoa.

Caso os resultados de GC sejam positivos ou inconclusivos, consulte *Interpretação do teste - controlo de qualidade/resultados do paciente*. Para mais informações sobre a monitorização de contaminações específicas do Sistema PANTHER, contacte a assistência técnica da Gen-Probe.

Interpretação do teste - controlo de qualidade/resultados do paciente

A. Interpretação do Teste

Os resultados dos ensaios são automaticamente interpretados pelo software do ensaio APTIMA utilizando o protocolo para GC. O resultado de um teste pode ser negativo, equívoco, positivo ou inválido, de acordo com a determinação a partir das RLU totais no passo de detecção (ver abaixo). O resultado de um teste pode ser inválido por os valores de RLU estarem fora dos intervalos normais esperados. Os resultados de testes iniciais dúbios e inválidos devem ser testados novamente.

Interpretação do Teste	Total de RLU (x1.000)
Negativo	0* a < 50
Equívoco	50 a < 100
RLU fracamente positivas[1,2,3]	100 a < 2.000
Positivo[1,2]	2.000 a < 12.000
Inválido	0* ou > 12.000

* Um resultado de zero para (0 x 1.000) RLU no relatório do teste representa um valor entre zero e 999 RLU. Valores de RLU inferiores a 160 nos Sistemas DTS ou a 690 no Sistema TIGRIS DTS ou no Sistema PANTHER constarão no relatório como inválidos.

1 De acordo com as orientações dos CDC, “há que considerar a realização de exames de rotina adicionais em pessoas com resultados positivos nos testes de rastreio de CT ou GC quando as informações acerca dos factores de risco ou pesquisas reais indicam que a prevalência é baixa resultando num menor PPV (p. ex., < 90%).” Consulte as orientações dos CDC para obter dados acerca de exames adicionais e do controlo dos pacientes após a realização de testes de rastreio positivos (1).

2 Consulte a Tabela 3 para a distribuição dos resultados de RLU. A magnitude das RLU não é indicativa do nível de organismos no espécime.

3 Na gama dos positives baixos, os dados sugerem que os resultados positivos devem ser interpretados com cautela, tendo a noção de que a probabilidade de o positivo ser falso pode ser mais elevada do que a de o positivo ser verdadeiro.

B. Resultados de Controlo de Qualidade e Aceitabilidade

O controlo negativo para GC APTIMA, rotulado “CONTROL + CT PCT / CONTROL – GC NGC” e o controlo positivo para GC APTIMA, rotulado “CONTROL + GC PGC / CONTROL – CT NCT”, actuam como controlos para os passos de captura do alvo, amplificação e detecção do ensaio. De acordo com directrizes ou exigências de regulamentos locais, estaduais e/ou federais, ou organizações de acreditação, controlos adicionais para lise celular e estabilização de RNA podem ser incluídos. O controlo positivo para GC, rotulado “CONTROL + GC PGC / CONTROL – CT NCT,” contém rRNA não infeccioso de GC. Caso o pretenda, pode encomendar mais controlos em kit.
A preparação correcta dos espécimes é confirmada visualmente pela presença de uma única zaragatoa de colheita APTIMA num tubo de transporte de esfregaços, um volume final de urina situado entre as linhas pretas de enchimento num tubo de transporte de espécimes de urina ou a ausência de qualquer zaragatoa num tubo de transferência de espécimes APTIMA para espécimes citológicos líquidos.

Os Controlos Positivos devem produzir os seguintes resultados de testes:

Controlo	Total de RLU (x1.000)	Resultado da GC
Controlo positivo, CT/ controlo negativo, GC	0* e < 50	Negativo
Controlo positivo, GC/ controlo negativo, CT	≥ 100 e < 12.000	Positivo

* Um resultado de zero para (0 x 1.000) RLU no relatório do teste representa um valor entre zero e 999 RLU. Valores de RLU inferiores a 160 nos Sistemas DTS ou a 690 no Sistema TIGRIS DTS ou no Sistema PANTHER constarão no relatório como inválidos.

1. O Software de Ensaio APTIMA avalia os controlos de acordo com os critérios acima, e relatará o Status de Execução como APROVADO (PASS) se os critérios do controlo de execução forem atendidos, e REPROVADO (FAIL) se os critérios do controlo de execução não forem atendidos.
2. Se o Status de Execução for REPROVADO (FAIL), todos os resultados de testes da mesma execução serão inválidos e não deverão ser relatados.
3. Cada laboratório deve implementar procedimentos de controlo adequados para atender aos requisitos dos regulamentos CLIA (secção 493.1256).

Nota: *Consulte a secção Resolução de Problemas ou contacte a assistência técnica da Gen-Probe para auxílio com controlos fora dos intervalos nos Sistemas DTS.*

4. Um parâmetro do Sistema TIGRIS DTS permite que cada local especifique uma frequência de "suporte de controlo", pela qual conjuntos adicionais de controlos podem ser colocados em intervalos definidos dentro da lista de trabalho. Caso este parâmetro seja especificado, o Sistema TIGRIS DTS exigirá que um conjunto de controlos seja aplicado após o número definido de espécimes no suporte de controlo. O Sistema TIGRIS DTS avalia automaticamente cada controlo na lista de trabalho de acordo com os critérios acima, e invalidará todos os espécimes no(s) suporte(s) de controlo(s) afectados, caso os critérios de controlos não seja atendido. Consulte o *TIGRIS DTS System Operator's Manual (Manual do Operador do Sistema TIGRIS DTS)* para obter mais detalhes.
5. Controlos negativos podem não ser efectivos na monitorização de transmissão aleatória. Consulte as *Desempenho analítico no Sistema TIGRIS DTS* para obter os resultados de um estudo de transmissão analítica de alto alvo que se realizou para demonstrar o controlo da transmissão no Sistema TIGRIS DTS. Consulte as *Desempenho analítico no Sistema PANTHER* para obter os resultados de um estudo de transmissão analítica de alto alvo que se realizou para demonstrar o controlo da transmissão no Sistema PANTHER.

C. Controlo da preparação de espécimes (opcional)

O controlo negativo para GC APTIMA, rotulado "CONTROL + CT PCT / CONTROL – GC NGC" e o controlo positivo para GC APTIMA, rotulado "CONTROL + GC PGC / CONTROL – CT NCT", actuam como controlos para os passos de captura do alvo, amplificação e detecção do ensaio e têm de ser incluídos em cada teste do ensaio. Se assim o pretender, os controlos para a lise celular e estabilização de RNA podem ser testados de acordo com as exigências das agências de acreditação adequadas ou com os procedimentos de cada laboratório. Espécimes positivos conhecidos podem servir como controlos sendo preparados e testados em conjunto com espécimes desconhecidos. Os espécimes usados como controlos de preparação devem ser armazenados, manipulados e testados de acordo com o folheto da embalagem. Os controlos de preparação de espécimes devem ser interpretados da mesma forma descrita para espécimes de testes de

pacientes. Consulte a secção *Interpretação do teste - controlo de qualidade/resultados do paciente*, *Resultados de Testes de Pacientes*.

D. Resultados de Testes de Pacientes

1. Se os controlos em qualquer execução não gerarem os resultados esperados, os resultados de testes em espécimes de pacientes na mesma execução não devem ser reportados.
2. Resultados de esfregaços, espécimes de urina e espécimes citológicos em base líquida PreservCyt. Ver *Notas* abaixo.

   a. Resultados iniciais

Pos para GC*	Positivo para GC rRNA.
Neg para GC	Presumidamente negativo para GC rRNA.
Equiv para GC	A amostra deve ser testada novamente.
Inválido	A amostra deve ser testada novamente.

   b. Resultados do Novo Teste

Pos para GC*	Positivo para rRNA de GC.
Neg para GC	Presumidamente negativo para GC rRNA.
Equiv para GC	Indeterminado, um novo espécime deve ser recolhido.
Inválido	Indeterminado, um novo espécime deve ser recolhido.

*Os resultados de espécimes com valores de RLU positivos baixos estão incluídos nesta categoria. Consulte a secção *Interpretação do teste - controlo de qualidade/resultados do paciente* acima.

Notas

- O primeiro resultado válido e não equívoco para cada analito é o resultado que deve ser relatado.
- Recomenda-se que sejam cuidadosamente ponderados os dados de desempenho aquando da interpretação dos resultados do ensaio APTIMA GC em participantes assintomáticos ou em quaisquer participantes de populações de prevalência baixa.
- Um resultado negativo não exclui a presença de infecção por GC, pois os resultados dependem de uma correcta colheita dos espécimes, da ausência de inibidores e da detecção de rRNA suficiente. Os resultados do teste podem ser afectados por uma colheita incorrecta dos espécimes, armazenamento inadequado dos espécimes, erro técnico, mistura de espécimes ou valores alvo abaixo do limite de detecção do ensaio.
- Recomendam-se os testes de espécimes endocervicais para pacientes femininas, sobre as quais há suspeitas clínicas de haver infecções por clamídia ou gonocócicas. Se forem recolhidos esfregaços citológicos e endocervicais, o espécime citológico líquido em solução PreservCyt tem de ser recolhido antes do espécime do esfregaço endocervical.

Limitações

A. A utilização deste ensaio se limita ao pessoal que foi treinado no procedimento. Não seguir as instruções dadas no folheto desta embalagem pode levar a resultados errados.

B. Os efeitos do uso de tampões, irrigação vaginal e variáveis relativas à colheita de espécimes não foram avaliados quanto ao seu impacto sobre a detecção de GC.

C. A presença de muco nos espécimes endocervicais não interfere na detecção de GC pelo ensaio APTIMA GC. Contudo, para assegurar uma correcta colheita de amostras endocervicais, há que remover o muco em excesso.

D. A amostragem de espécimes de urina, esfregaços vaginais e espécimes citológicos em base líquida PreservCyt não foi concebida para substituir os exames ao colo do útero e a colheita de espécimes endocervicais para o diagnóstico de infecções urogenitais femininas. Os pacientes podem ter cervicite, uretrite, infecções do tracto urinário ou infecções vaginais devido a outras causas ou infecções simultâneas com outros agentes.

E. O ensaio APTIMA GC não tem por finalidade a avaliação de suspeita de abuso sexual ou para outras indicações médico-legais. Para os pacientes que possam vir a sofrer um impacto psicossocial adverso por causa de um resultado falso positivo, os CDC recomendam a realização de novos testes por um método que utilize uma tecnologia alternativa (1).

F. Resultados fiáveis dependem da colheita adequada de espécimes. Como o sistema de transporte utilizado para este ensaio não permite a avaliação microscópica de adequação do espécime, o treinamento de médicos em técnicas adequadas de colheita de espécimes é necessário. Consulte o folheto informativo do kit de colheita de espécimes APTIMA adequado.

G. O fracasso ou o sucesso terapêutico não podem ser determinados com o ensaio APTIMA GC pois os ácidos nucleicos podem persistir após uma terapêutica antimicrobiana adequada.

H. Os resultados do ensaio APTIMA GC devem ser interpretados em conjunto com outros dados laboratoriais e clínicos de que o médico disponha.

I. Um resultado negativo não impede a possível infecção porque os resultados dependem da colheita adequada de espécimes. Os resultados de teste podem ser afectados por colheita inadequada de espécimes, erro técnico, mistura de espécimes ou níveis do alvo abaixo do limite de detecção do ensaio.

J. O ensaio APTIMA GC fornece resultados qualitativos. Portanto, não se pode fazer uma correlação entre a magnitude de um sinal positivo de ensaio e o número de organismos em um espécime.

K. No caso de estudos clínicos de espécimes de esfregaços vaginais, esfregaços endocervicais, esfregaços uretrais masculinos e espécimes de urina, o desempenho da detecção de GC deriva de populações de prevalência elevada. Os resultados positivos em populações de baixa prevalência devem ser interpretados com cautela, tendo a noção de que a probabilidade de o positivo ser falso pode ser mais elevada do que a de o positivo ser verdadeiro.

L. Para os ensaios clínicos de espécimes citológicos em base líquida PreserCyt, o desempenho do ensaio APTIMA GC na detecção de GC é obtido sobretudo de populações de baixa prevalência. Não obstante, resultados positivos em populações de baixa prevalência devem ser interpretados cuidadosamente levando em consideração que a probabilidade de um falso positivo podem ser mais alta do que um positivo verdadeiro.

M. O desempenho do kit de transferência de espécimes APTIMA não foi avaliado quanto à análise do mesmo espécime citológico líquido em solução PreservCyt antes e após o processamento citológico ThinPrep.

N. Os espécimes citológicos em base líquida PreservCyt processados em outros instrumentos além do ThinPrep 2000 Processor não foram avaliados quanto à utilização com ensaios APTIMA.

O. Os espécimes de esfregaços vaginais recolhidos pela paciente são uma opção para efectuar o rastreio de mulheres quando um exame pélvico não for indicado de outro modo.

P. A aplicação a esfregaços vaginais colhidos pela paciente limita-se a instituições de saúde que disponham de apoio/aconselhamento para explicar os procedimentos e as precauções.

Q. O ensaio APTIMA GC não foi validado para utilização em esfregaços vaginais colhidos em casa pelas pacientes.

R. O desempenho dos esfregaços vaginais não foi avaliado em grávidas.

S. O desempenho dos espécimes de esfregaços endocervicais, vaginais, uretrais masculinos e dos espécimes de urina feminina e masculina, assim como dos espécimes citológicos em base líquida PreservCyt, não foi avaliado em adolescentes com menos de 16 anos de idade.

T. O teste de esfregaços uretrais de homens assintomáticos não é recomendado devido ao baixo valor preditivo do resultado positivo obtido nesta população no ensaio clínico.

U. O desempenho do Sistema TIGRIS DTS não foi determinado a altitudes acima dos 2240 m (7355 pés). Realizar-se-ão verificações volumétricas adicionais e estudos específicos para os ensaios antes ou como parte do processo de instalação e aceitação em laboratórios acima dos 2240 m (7355 pés) de altitude.

V. O desempenho do Sistema PANTHER não foi determinado a altitudes acima dos 2000 m (6561 pés).

W. Não há evidências de degradação de ácidos nucléicos em Solução PreservCyt. Se um espécime citológico em base líquida PreservCyt apresentar um número baixo de material celular de GC, pode ocorrer uma distribuição não homogénea deste material celular. Além disso, quando comparado com amostras directas de Meio de Transporte de Esfregaços APTIMA, o volume adicional de solução PreservCyt resulta em maior diluição do material de amostra. Esses factores podem afectar a habilidade de detectar pequena quantidade de organismos no material colhido. Se resultados negativos dos espécimes não se encaixarem na impressão clínica, um novo espécime pode ser necessário.

X. Clientes devem validar um processo de transferência LIS independentemente.

Resultados de Estudos Clínicos

As características de desempenho do ensaio APTIMA GC foram estabelecidas em duas investigações clínicas realizadas na América do Norte. A primeira investigação clínica estabeleceu a sensibilidade, a especificidade e os valores preditivos do ensaio APTIMA GC utilizando esfregaços colhidos pelo médico de origem endocervical, vaginal e uretral masculina, esfregaços vaginais colhidos pela paciente e espécimes de urina de ambos os sexos. Além disso, a primeira investigação avaliou também a precisão do ensaio APTIMA GC quando realizado de acordo com as Orientações do NCCLS (12). A segunda investigação clínica estabeleceu a sensibilidade, especificidade e os valores preditivos do ensaio APTIMA GC utilizando meio de transporte PreservCyt (componente do ThinPrep 2000 System). Os espécimes citológicos em base líquida PreservCyt foram também avaliados quanto à precisão intralaboratorial com o ensaio APTIMA GC.

Valores esperados dos Sistemas DTS

Prevalência

A prevalência de GC nas populações de pacientes depende de factores de risco como a idade, o sexo, a presença de sintomas, o tipo de clínica e o método de teste. O resumo da prevalência de GC na América do Norte, por tipo de espécime e determinada pelo ensaio APTIMA GC, é apresentado nas Tabelas 1 e 1a para duas investigações clínicas. Consulte as secções *Estudo de espécimes clínicos em esfregaços endocervicais, esfregaços uretrais masculinos, esfregaços vaginais e espécimes de urina*, e *Estudo de espécimes clínicos usando espécimes citológicos líquidos em PreservCyt* na secção de *Desempenho clínico nos Sistemas DTS* para obter uma descrição das características de desempenho dos espécimes clínicos.

Tabela 1: Prevalência de N. gonorrhoeae por local clínico e global determinada a partir dos resultados do ensaio APTIMA GC

	% (n.º positivos / n.º testado)											
Local	**EM**		**UM**		**EF**		**UF**		**PVS**		**CVS**	
1	21,4	(54/252)	21,4	(54/252)	6,1	(14/229)	5,7	(13/230)	6,4	(14/219)	6,1	(14/230)
2	26,5	(93/351)	20,1	(71/354)	16,1	(32/199)	15,0	(30/200)	16,2	(32/198)	16,6	(33/199)
3	0,0	(0/4)	0,0	(0/4)	4,4	(5/114)	3,5	(4/113)	3,6	(4/111)	3,5	(4/113)
4	N/A		N/A		2,3	(6/266)	1,9	(5/270)	2,2	(6/267)	3,0	(8/269)
5	5,5	(11/200)	5,5	(11/200)	1,5	(3/199)	1,0	(2/199)	1,0	(2/199)	1,0	(2/199)
6	14,5	(44/304)	13,4	(41/305)	8,2	(24/294)	5,7	(17/296)	8,3	(24/290)	7,5	(22/295)
7	5,8	(12/207)	5,8	(12/207)	0,0	(0/102)	0,0	(0/102)	0,0	(0/102)	0,0	(0/102)
8	N/A		N/A		2,0	(1/49)	2,0	(1/49)	2,1	(1/48)	2,0	(1/51)
Tudo	16,2	(214/1.318)	14,3	(189/1.322)	5,9	(85/1.452)	4,9	(72/1.459)	5,8	(83/1.434)	5,8	(84/1.458)

EM = esfregaço uretral masculino; **UM** = urina masculina; **EF** = esfregaço endocervical feminino; **UF** = urina feminina; **PVS** = esfregaço vaginal colhido por paciente; **CVS** = esfregaço vaginal colhido pelo médico.

Tabela 1a: Prevalência de N. gonorrhoeae por local clínico e global determinada a partir dos resultados do ensaio APTIMA GC utilizando espécimes citológicos em base líquida PreservCyt

Local	% (n.º positivos / n.º testado)	
1	5,0	(5/100)
2	0,8	(1/124)
3	0,8	(4/475)
4	1,4	(4/287)
5	0,0	(0/297)
6	0,5	(2/364)
Tudo	1,0	(16/1.647)

Valores preditivos positivos e negativos para taxas de prevalência hipotéticas na América do Norte

Os valores preditivos positivos e negativos estimados (PPV e NPV) para diferentes taxas de prevalência hipotéticas com a utilização do ensaio APTIMA GC são apresentados na Tabela 2. Estes cálculos baseiam-se em taxas de prevalência hipotéticas e na sensibilidade e na especificidade globais estimadas a partir do estado de infecção do paciente. A sensibilidade e a especificidade globais para GC foram de 97,6% e 99,3%, respectivamente (Tabela 2). Os valores reais de PPV e NPV para esfregaços endocervicais, esfregaços vaginais e esfregaços uretrais masculinos colhidos pelo médico, esfregaços vaginais colhidos pelas pacientes e espécimes de urina de ambos os sexos são indicados na Tabela 6 para cada local clínico e a nível global. Os valores reais de PPV e NPV em espécimes citológicos em base líquida PreservCyt são indicados na Tabela 6a.

Tabela 2: Valores preditivos positivos e negativos para taxas de prevalência hipotéticas na América do Norte

Taxa de prevalência hipotética (%)	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	PPV (%)	NPV (%)
1	97,6	99,3	58,7	100,0
2	97,6	99,3	74,1	100,0
5	97,6	99,3	88,1	99,9
10	97,6	99,3	94,0	99,7
15	97,6	99,3	96,1	99,6
20	97,6	99,3	97,2	99,4
25	97,6	99,3	97,9	99,2
30	97,6	99,3	98,4	99,0

Distribuição de RLU no ensaio APTIMA GC

A Figura 4 mostra a distribuição de RLU para o ensaio APTIMA GC relativamente aos seguintes tipos de espécimes analisados no estudo clínico: de participantes sintomáticos, esfregaços endocervicais, esfregaços vaginais e esfregaços uretrais masculinos colhidos pelo médico, assim como espécimes de urina de ambos os sexos colhidos pelo paciente; de participantes assintomáticos, esfregaços endocervicais e vaginais colhidos pelo médico, assim como esfregaços vaginais e espécimes de urina de ambos os sexos colhidos pelos pacientes. A Tabela 3 indica a distribuição de RLU para os resultados positivos totais e negativos totais, bem como os resultados positivos falsos e negativos falsos para estes tipos de espécimes, relativamente ao estado de infecção do paciente. Entre certos tipos de espécimes, verifica-se uma tendência para o aumento da proporção de positivos verdadeiros quando os valores de RLU aumentam.

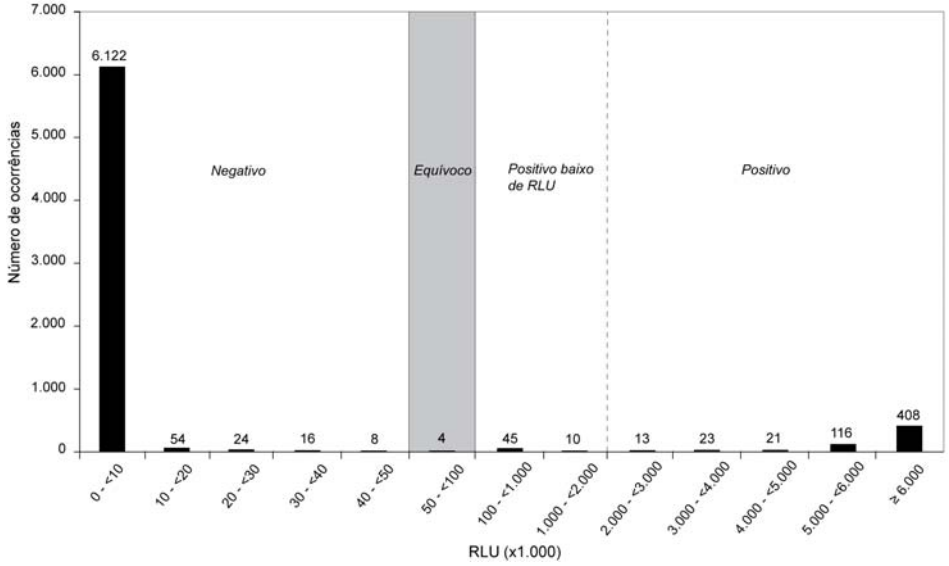

Figura 4. Frequência da distribuição de RLU do ensaio APTIMA GC

Tabela 3: Distribuição de RLU no ensaio APTIMA GC

	RLU (x1.000)												
	0 - <10	**10 - <20**	**20 - <30**	**30 - <40**	**40 - <50**	**50 - <100**	**100 - <1.000**	**1.000 - <2.000**	**2.000 - <3.000**	**3.000 - <4.000**	**4.000 - <5.000**	**5.000 - <6.000**	**≥6.000**
Positivos totais						**-**	**45**	**10**	**13**	**23**	**21**	**116**	**408**
Falsos positivos totais						**-**	**35**	**6**	**2**	**4**	**0**	**3**	**0**
CVS						1	5	3	0	1	0	2	0
PVS						0	2	0	0	1	0	1	0
EF						2	12	1	0	0	0	0	0
EM						1	9	0	1	0	0	0	0
UF						0	2	0	0	1	0	0	0
UM						0	5	2	1	1	0	0	0
Negativos totais	**6.122**	**54**	**24**	**16**	**8**	**-**							
Falsos negativos totais	**7**	**2**	**1**	**2**	**1**	**-**							
CVS	2	0	0	0	0	-							
PVS	0	0	0	0	0	-							
EF	0	0	0	1	1	-							
EM	0	1	0	0	0	-							
UF	3	1	1	1	0	-							
UM	2	0	0	0	0	-							

CVS = esfregaço vaginal colhido pelo médico; **PVS** = esfregaço vaginal colhido apenas por pacientes assintomáticas;
EF = esfregaço endocervical feminino; **EM** = esfregaço uretral masculino apenas de participantes sintomáticos;
UF = urina feminina; **UM** = urina masculina.
A coluna sombreada designa a zona equívoca.

Desempenho clínico nos Sistemas DTS

Consulte a *Concordância dos espécimes clínicos no Sistema TIGRIS DTS* após a secção *Desempenho analítico nos Sistemas DTS* para obter o desempenho clínico específico do Sistema TIGRIS DTS.

Estudo de espécimes clínicos em esfregaços endocervicais, esfregaços uretrais masculinos, esfregaços vaginais e espécimes de urina

Foram colhidos esfregaços endocervicais, esfregaços vaginais e esfregaços uretrais masculinos pelo médico, esfregaços vaginais colhidos pela paciente, assim como espécimes de urina de ambos os sexos colhidos pelos pacientes, a 2.787 participantes sintomáticos e assintomáticos do sexo masculino e do sexo feminino utentes de clínicas de OB/GINEC, doenças sexualmente transmissíveis (DST), adolescentes e planeamento familiar de oito locais clínicos geograficamente distintos da América do Norte. Os participantes foram classificados como sintomáticos quando houve relato pelo participante de sintomas como corrimento, disúria e dor pélvica. Os pacientes foram classificados como assintomáticos se não relataram sintomas. Dos 1.392 participantes assintomáticos incluídos no estudo, 2 tinham menos de 16 anos, 237 tinham idades entre 16 e 20, 423 tinham idades entre 21 e 25 e 730 tinham idade superior a 25 anos. Dos 1.395 participantes sintomáticos incluídos no estudo, 211 tinham idades entre 16 e 20, 494 tinham idades entre 21 e 25 e 690 tinham idade superior a 25 anos.

Foram colhidos três espécimes de cada um dos 1.322 participantes elegíveis do sexo masculino. Foram colhidos cinco espécimes de cada um dos 1.465 participantes elegíveis do sexo feminino. No caso dos sujeitos masculinos, foram colhidos aleatoriamente dois esfregaços uretrais seguidos de um espécime de urina. No caso dos participantes do sexo feminino, foi colhido um espécime de urina, seguido por um esfregaço vaginal colhido pela paciente, um esfregaço vaginal colhido pelo médico e dois esfregaços endocervicais aleatórios. Foram gerados resultados pelo ensaio APTIMA GC e pelo ensaio APTIMA COMBO 2 para os dois esfregaços vaginais, um esfregaço endocervical um esfregaço uretral masculino e uma alíquota de urina masculina e outra feminina. Os restantes esfregaços endocervicais, esfregaços uretrais masculinos e uma alíquota de urina masculina e outra feminina foram testados com outros NAAT disponíveis no mercado. Os espécimes de esfregaço endocervical, esfregaço uretral masculino e urina masculina e feminina testados com o ensaio APTIMA COMBO 2 e com o outro NAAT disponível no mercado foram utilizados como NAAT de referência para determinar o estado de infecção de cada participante. O teste de espécimes foi conduzido ou no local do registo do paciente ou em um local de teste externo.

Todos os cálculos do desempenho se basearam no número total de resultados obtidos no ensaio APTIMA GC para esfregaços endocervicais, vaginais e uretrais masculinos colhidos pelo médico e espécimes de urina masculina e feminina, em comparação com um algoritmo de estado de infecção do paciente para cada sexo. No algoritmo, a designação de um participante como infectado ou não infectado com GC teve como base os resultados dos esfregaços e espécimes de urina obtidos com o ensaio APTIMA COMBO 2 disponível no mercado e com o outro NAAT disponível no mercado. Os participantes foram considerados infectados por GC se dois dos quatro espécimes de esfregaço e urina deram resultados positivos com o ensaio APTIMA COMBO 2 e com o outro NAAT de referência (um espécime com teste positivo em cada NAAT). Os pacientes foram considerados não infectados se menos de dois resultados NAAT de referência tiveram resultado positivo. Não se utilizaram culturas como teste de referência.

No total, foram utilizados 7.653 resultados do ensaio APTIMA GC para calcular a sensibilidade e a especificidade. A sensibilidade e a especificidade para GC por sexo, tipo de espécime e estado sintomático, conforme o caso, são apresentadas na Tabela 4. A Tabela 6 mostra a sensibilidade, a especificidade e os valores preditivos do ensaio APTIMA GC em comparação com o estado de infecção do paciente para cada instituição clínica e no geral. As Tabelas 7a - 7e resumem o número de resultados de participantes sintomáticos e assintomáticos designados como infectados ou não infectados com GC de acordo com o algoritmo de estado de infecção do paciente.

Dos 2.787 participantes incluídos, o estado de infecção por GC era desconhecido em 15. Os pacientes foram designados com um estado de infecção do paciente desconhecido se havia falta de resultados que evitassem determinações conclusivas de status de infecção. Os resultados destes participantes não foram incluídos em quaisquer cálculos do desempenho. Dos 7.704 resultados do ensaio APTIMA GC, 22 espécimes (0,29%) apresentaram inicialmente resultados do ensaio inválidos ou equívocos. Quando se voltou a testar estes espécimes, 4 continuaram a ser equívocos e foram excluídos das análises. Os restantes 18 espécimes produziram resultados válidos no teste após a sua repetição e foram utilizados nos cálculos do desempenho clínico.

Tabela 4: Sensibilidade e especificidade do ensaio APTIMA GC relativamente ao estado de infecção do paciente por estado sintomático e global, para esfregaços uretrais masculinos, urina masculina, esfregaços endocervicais femininos, urina feminina, esfregaços vaginais colhidos por pacientes assintomáticas e esfregaços vaginais colhidos pelo médico

Espécime		Estado sintomático	N	PV	FP	NV	FN	Sensibilidade (IC de 95%)		Especificidade (IC de 95%)	
Masculino	Esfregaço	Sintomático	575	171	10[a]	393	1	99,4	(96,8 - 100)	97,5	(95,5 - 98,8)
	Urina	Sintomático	576	171	4[b]	400	1	99,4	(96,8 - 100)	99,0	(97,5 - 99,7)
		Assintomático	745	9	5[c]	730	1	90,0	(55,5 - 99,7)	99,3	(98,4 - 99,8)
		Tudo	1.321	180	9[d]	1.130	2	98,9	(96,1 - 99,9)	99,2	(98,5 - 99,6)
Feminino	Esfregaço	Sintomático	805	52	8[e]	744	1	98,1	(89,9 - 100)	98,9	(97,9 - 99,5)
		Assintomático	635	20	5[f]	609	1	95,2	(76,2 - 99,9)	99,2	(98,1 - 99,7)
		Tudo	1.440	72	13[g]	1.353	2	97,3	(90,6 - 99,7)	99,0	(98,4 - 99,5)
	Urina	Sintomático	810	48	2[h]	755	5	90,6	(79,3 - 96,9)	99,7	(99,0 - 100)
		Assintomático	639	21	1[i]	616	1	95,5	(77,2 - 99,9)	99,8	(99,1 - 100)
		Tudo	1.449	69	3[j]	1.371	6	92,0	(83,4 - 97,0)	99,8	(99,4 - 100)
Colhido pela Paciente	Esfregaço vaginal	Assintomático	629	21	4[k]	604	0	100	(83,9 - 100)	99,3	(98,3 - 99,8)
Colhido pelo Médico	Esfregaço vaginal	Sintomático	809	52	7[m]	749	1	98,1	(89,9 - 100)	99,1	(98,1 - 99,6)
		Assintomático	637	21	4[n]	611	1	95,5	(77,2 - 99,9)	99,3	(98,3 - 99,8)
		Tudo	1.446	73	11[o]	1.360	2	97,3	(90,7 - 99,7)	99,2	(98,6 - 99,6)

PV = positivo verdadeiro; **FP** = falso positivo; **NV** = negativo verdadeiro; **FN** = falso negativo.

Resultados do ensaio APTIMA COMBO 2 para GC: n.º resultados positivos / n.º espécimes testado a: 2/10 b: 1/4 c: 1/5 d: 2/9 e: 5/8 f: 2/5 g: 7/13 h: 1/2 i: 1/1 j: 2/3 k: 3/4 l: 8/11 m: 6/7 n: 3/4 o: 9/11.

Estudo de espécimes clínicos usando espécimes citológicos líquidos em PreservCyt

Foi realizado um estudo clínico multicêntrico prospectivo para avaliar a utilização do meio de transporte PreservCyt (um componente do ThinPrep 2000 System) como meio alternativo para espécimes ginecológicos destinados à detecção de *N. gonorrhoeae* pelo ensaio APTIMA GC. Foram incluídos e avaliados no estudo clínico 1.647 participantes sintomáticos e assintomáticos utentes de clínicas de OB/GINEC, planeamento familiar, saúde pública, saúde da mulher e de DST. Destes participantes, 1.288 eram assintomáticos e 359 eram sintomáticos (Tabela 7e). Os sujeitos foram incluídos a partir de locais com uma prevalência de GC que variou entre 0,0% e 5,0% (Tabela 6a).

Foram colhidos dois espécimes por cada indivíduo elegível: um espécime citológico em base líquida PreservCyt e um esfregaço endocervical. Os espécimes citológicos em base líquida PreservCyt foram colhidos com a espátula/escova citológica ou com um dispositivo de amostragem cervical semelhante a uma escova. A distribuição dos dispositivos de amostragem cervical é resumida na Tabela 5 por local de colheita do espécime e a nível geral.

Os espécimes citológicos em base líquida PreservCyt foram processados de acordo com o manual de instruções do ThinPrep 2000 Processor e de acordo com o folheto informativo do kit de transferência de amostras APTIMA. Após o processamento do espécime citológico em base líquida PreservCyt com o ThinPrep 2000 Processor, o espécime foi transferido para o kit de transferência de espécimes APTIMA para análise com o ensaio APTIMA GC.

A sensibilidade e a especificidade do ensaio APTIMA GC em espécimes citológicos em base líquida PreservCyt foram calculadas comparando os resultados com o estado de infecção do paciente. O algoritmo incluiu os resultados do ensaio APTIMA COMBO 2 e do ensaio APTIMA GC em esfregaços endocervicais. Para estabelecer um estado de infecção do paciente positivo, exigia-se que ambos os NAAT de referência dessem resultados positivos. Para estabelecer um estado de infecção do paciente negativo, exigia-se que pelo menos um NAAT de referência desse resultado negativo. O único resultado equívoco obtido de um NAAT de referência foi considerado discordante com o ensaio de investigação para efeitos do cálculo do desempenho, tendo o estado de infecção do paciente sido assim categorizado como não-infectado (n=1). A Tabela 7e resume a frequência dos resultados do teste para os esfregaços endocervicais testados com o ensaio APTIMA COMBO 2 e com o ensaio APTIMA GC.

A Tabela 5a mostra as sensibilidades e as especificidades do ensaio APTIMA GC por estado sintomático e a nível geral. A sensibilidade global foi de 92,3% (12/13). Nos participantes sintomáticos e assintomáticos, as sensibilidades foram de 100% (7/7) e 83,3% (5/6), respectivamente. A especificidade global foi de 99,8% (1.630/1.634). Nos participantes sintomáticos e assintomáticos, as especificidades foram de 99,4% (350/352) e 99,8% (1.280/1.282), respectivamente.

A Tabela 6a mostra as sensibilidades e as especificidades do ensaio APTIMA GC por local de colheita dos espécimes e a nível geral. As sensibilidades variaram entre 80,0% e 100%. As especificidades variaram entre 99,0% e 100%.

Tabela 5: Distribuição do dispositivo de amostragem cervical utilizado em espécimes citológicos em base líquida PreservCyt

Dispositivo de amostragem cervical utilizado	Local de Colheita Clínica						Total
	1	2	3	4	5	6	
Espátula/Cytobrush	0	124	475	287	57	364	1.307
Dispositivo tipo escova	100	0	0	0	240	0	340

Tabela 5a: Sensibilidade e especificidade do ensaio APTIMA GC relativamente ao estado de infecção do paciente, por estado sintomático e a nível geral, em espécimes citológicos em base líquida PreservCyt

Symptom	Resultados dos espécimes citológicos em base líquida PreservCyt	+/+	+/-	-/+	-/-	Sensibilidade (%) (IC de 95%)	Especificidade (%) (IC de 95%)
Sintomático	Positivo	7	0	0	2	100 (7/7) (59,0 - 100)	99,4 (350/352) (98,0 - 99,9)
	Negativo	0	0	0	350		
	Total	7	0	0	352		
Assintomático	Positivo	5	0	1[1]	1	83,3 (5/6) (35,9 - 99,6)	99,8 (1.280/1.282) (99,4 -100)
	Negativo	1	0	5	1.275		
	Total	6	0	6	1.276		
Tudo	Positivo	12	0	1	3	92,3 (12/13) (64,0 - 99,8)	99,8 (1.630/1.634) (99,4 - 99,9)
	Negativo	1	0	5	1.625		
	Total	13	0	6	1.628		

+/+ = Resultado positivo em esfregaço endocervical no ensaio APTIMA COMBO 2/Resultado positivo em esfregaço endocervical no ensaio APTIMA GC.

+/- = Resultado positivo em esfregaço endocervical no ensaio APTIMA COMBO 2/Resultado negativo em esfregaço endocervical no ensaio APTIMA GC.

-/+ = Resultado negativo em esfregaço endocervical no ensaio APTIMA COMBO 2/Resultado positivo em esfregaço endocervical no ensaio APTIMA GC.

-/- = Resultado negativo em esfregaço endocervical no ensaio APTIMA COMBO 2/Resultado negativo em esfregaço endocervical no ensaio APTIMA GC.

[1]Um espécime teve um resultado discordante: Resultado equívoco em esfregaço endocervical no ensaio APTIMA COMBO 2/Resultado positivo em esfregaço endocervical no ensaio APTIMA GC.

Tabela 6: Sensibilidade, especificidade e valores preditivos do ensaio APTIMA GC relativamente ao estado de infecção do paciente, por local clínico e global, para esfregaços uretrais masculinos, urina masculina, esfregaços endocervicais femininos, urina feminina, esfregaços vaginais colhidos por pacientes assintomáticas e esfregaços vaginais colhidos pelo médico

Espécime		Local	N	PV	FP	NV	FN	Prev (%)	Sensibilidade (IC de 95%)		Especificidade (IC de 95%)		PPV (%)	NPV (%)
Masculino	**Esfregaço**	**1**	145	49	0	96	0	33,8	100	(92,7 - 100)	100	(96,2 - 100)	100	100
		2	177	66	8	102	1	37,9	98,5	(92,0 - 100)	92,7	(86,2 - 96,8)	89,2	99,0
		3	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A		N/A		N/A	N/A	N/A
		4	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A		N/A		N/A	N/A	N/A
		5	49	7	1	41	0	14,3	100	(59,0 - 100)	97,6	(87,4 - 99,9)	87,5	100
		6	150	37	1	112	0	24,7	100	(90,5 - 100)	99,1	(95,2 - 100)	97,4	100
		7	54	12	0	42	0	22,2	100	(73,5 - 100)	100	(91,6 - 100)	100	100
		8	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A		N/A		N/A	N/A	N/A
		Tudo	575	171	10	393	1	29,9	99,4	(96,8 - 100)	97,5	(95,5 - 98,8)	94,5	99,7
	Urina	**1**	252	53	1	198	0	21,0	100	(93,3 - 100)	99,5	(97,2 - 100)	98,1	100
		2	353	68	3	280	2	19,8	97,1	(90,1 - 99,7)	98,9	(96,9 - 99,8)	95,8	99,3
		3	4	0	0	4	0	0,0		N/A	100	(39,8 - 100)	N/A	100
		4	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A		N/A		N/A	N/A	N/A
		5	200	8	3	189	0	4,0	100	(63,1 - 100)	98,4	(95,5 - 99,7)	72,7	100
		6	305	39	2	264	0	12,8	100	(91,0 - 100)	99,2	(97,3 - 99,9)	95,1	100
		7	207	12	0	195	0	5,8	100	(73,5 - 100)	100	(98,1 - 100)	100	100
		8	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A		N/A		N/A	N/A	N/A
		Tudo	1.321	180	9	1.130	2	13,8	98,9	(96,1 - 99,9)	99,2	(98,5 - 99,6)	95,2	99,8

Tabela 6: Sensibilidade, especificidade e valores preditivos do ensaio APTIMA GC relativamente ao estado de infecção do paciente, por local clínico e global, para esfregaços uretrais masculinos, urina masculina, esfregaços endocervicais femininos, urina feminina, esfregaços vaginais colhidos por pacientes assintomáticas e esfregaços vaginais colhidos pelo médico (continua)

Espécime		Local	N	PV	FP	NV	FN	Prev (%)	Sensibilidade (IC de 95%)		Especificidade (IC de 95%)		PPV (%)	NPV (%)
Feminino	Esfregaço	1	226	12	2	212	0	5,3	100	(73,5 - 100)	99,1	(96,7 - 99,9)	85,7	100
		2	197	29	3	164	1	15,2	96,7	(82,8 - 99,9)	98,2	(94,8 - 99,6)	90,6	99,4
		3	114	4	1	109	0	3,5	100	(39,8 - 100)	99,1	(95,0 - 100)	80,0	100
		4	260	5	1	254	0	1,9	100	(47,8 - 100)	99,6	(97,8 - 100)	83,3	100
		5	199	2	1	196	0	1,0	100	(15,8 - 100)	99,5	(97,2 - 100)	66,7	100
		6	294	19	5	269	1	6,8	95,0	(75,1 - 99,9)	98,2	(95,8 - 99,4)	79,2	99,6
		7	102	0	0	102	0	0,0		N/A	100	(96,4 - 100)	N/A	100
		8	48	1	0	47	0	2,1	100	(2,5 - 100)	100	(92,5 - 100)	100	100
		Tudo	1.440	72	13	1.353	2	5,1	97,3	(90,6 - 99,7)	99,0	(98,4 - 99,5)	84,7	99,9
	Urina	1	227	11	2	213	1	5,3	91,7	(61,5 - 99,8)	99,1	(96,7 - 99,9)	84,6	99,5
		2	198	30	0	167	1	15,7	96,8	(83,3 - 99,9)	100	(97,8 - 100)	100	99,4
		3	113	4	0	109	0	3,5	100	(39,8 - 100)	100	(96,7 - 100)	100	100
		4	265	5	0	260	0	1,9	100	(47,8 - 100)	100	(98,6 - 100)	100	100
		5	199	2	0	197	0	1,0	100	(15,8 - 100)	100	(98,1 - 100)	100	100
		6	296	16	1	275	4	6,8	80,0	(56,3 - 94,3)	99,6	(98,0 - 100)	94,1	98,6
		7	102	0	0	102	0	0,0		N/A	100	(96,4 - 100)	N/A	100
		8	49	1	0	48	0	2,0	100	(2,5 - 100)	100	(92,6 - 100)	100	100
		Tudo	1.449	69	3	1.371	6	5,2	92,0	(83,4 - 97,0)	99,8	(99,4 - 100)	95,8	99,6
Colhido pela Paciente	Esfregaço vaginal (assinto-mática)	1	70	5	1	64	0	7,1	100	(47,8 - 100)	98,5	(91,7 - 100)	83,3	100
		2	46	7	1	38	0	15,2	100	(59,0 - 100)	97,4	(86,5 - 99,9)	87,5	100
		3	45	2	0	43	0	4,4	100	(15,8 - 100)	100	(91,8 - 100)	100	100
		4	152	1	0	151	0	0,7	100	(2,5 - 100)	100	(97,6 - 100)	100	100
		5	130	1	0	129	0	0,8	100	(2,5 - 100)	100	(97,2 - 100)	100	100
		6	75	5	2	68	0	6,7	100	(47,8 - 100)	97,1	(90,1 - 99,7)	71,4	100
		7	68	0	0	68	0	0,0		N/A	100	(94,7,7 - 100)	N/A	100
		8	43	0	0	43	0	0,0		N/A	100	(91,8 - 100)	N/A	100
		Tudo	629	21	4	604	0	3,3	100	(83,9 - 100)	99,3	(98,3 - 99,8)	84,0	100
Colhido pelo Médico	Esfregaço vaginal	1	227	12	2	213	0	5,3	100	(73,5 - 100)	99,1	(96,7 - 99,9)	85,7	100
		2	197	30	3	163	1	15,7	96,8	(83,3 - 99,9)	98,2	(94,8 - 99,6)	90,9	99,4
		3	113	4	0	109	0	3,5	100	(39,8 - 100)	100	(96,7 - 100)	100	100
		4	263	5	3	255	0	1,9	100	(47,8 - 100)	98,8	(96,6 - 99,8)	62,5	100
		5	199	2	0	197	0	1,0	100	(15,8 - 100)	100	(98,1 - 100)	100	100
		6	295	19	3	272	1	6,8	95,0	(75,1 - 99,9)	98,9	(96,8 - 99,8)	86,4	99,6
		7	102	0	0	102	0	0,0		N/A	100	(96,4 - 100)	N/A	100
		8	50	1	0	49	0	2,0	100	(2,5 - 100)	100	(92,7 - 100)	100	100
		Tudo	1.446	73	11	1.360	2	5,2	97,3	(90,7 - 99,7)	99,2	(98,6 - 99,6)	86,9	99,9

PV = positivo verdadeiro; **FP** = falso positivo; **NV** = negativo verdadeiro; **FN** = falso negativo.

Tabela 6a: Sensibilidade, especificidade e valores preditivos do ensaio APTIMA GC relativamente ao estado de infecção do paciente, por local clínico e a nível geral, em espécimes citológicos em base líquida PreservCyt

Local	Resultados dos espécimes citológicos em base líquida PreservCyt	+/+	+/-	-/+	-/-	Prev (%)	Sensibilidade (%) (IC de 95%)	Especificidade (%) (IC de 95%)	PPV(%)	NPV(%)
1	Positivo	5	0	0	0	5,0	100 (5/5) (47,8 - 100)	100 (95/95) (96,2 - 100)	100	100
	Negativo	0	0	0	95					
	Total	5	0	0	95					
2	Positivo	1	0	0	0	0,8	100 (1/1) (2,5 - 100)	100 (123/123) (97,0 - 100)	100	100
	Negativo	0	0	0	123					
	Total	1	0	0	123					
3	Positivo	4	0	0	0	1,1	80,0 (4/5) (28,4 - 99,5)	100 (470/470) (99,2 - 100)	100	99,8
	Negativo	1	0	0	470					
	Total	5	0	0	470					
4	Positivo	1	0	0	3	0,3	100 (1/1) (2,5 - 100)	99,0 (283/286) (97,0 - 99,8)	25,0	100
	Negativo	0	0	3	280					
	Total	1	0	3	283					
5	Positivo	0	0	0	0	0,0	N/A	100 (297/297) (98,8 - 100)	N/A	100
	Negativo	0	0	0	297					
	Total	0	0	0	297					
6	Positivo	1	0	1[1]	0	0,3	100 (1/1) (2,5 - 100)	99,7 (362/363) (98,5 - 100)	50,0	100
	Negativo	0	0	2	360					
	Total	1	0	3	360					
TODOS	Positivo	12	0	1	3	0,8	92,3 (12/13) (64,0 - 99,8)	99,8 (1.630/1.634) (99,4 - 99,9)	75,0	99,9
	Negativo	1	0	5	1.625					
	Total	13	0	6	1.628					

N/A = não aplicável.

+/+ = Resultado positivo em esfregaço endocervical no ensaio APTIMA COMBO 2/Resultado positivo em esfregaço endocervical no ensaio APTIMA GC.

+/- = Resultado positivo em esfregaço endocervical no ensaio APTIMA COMBO 2/Resultado negativo em esfregaço endocervical no ensaio APTIMA GC.

-/+ = Resultado negativo em esfregaço endocervical no ensaio APTIMA COMBO 2/Resultado positivo em esfregaço endocervical no ensaio APTIMA GC.

-/- = Resultado negativo em esfregaço endocervical no ensaio APTIMA COMBO 2/Resultado negativo em esfregaço endocervical no ensaio APTIMA GC.

[1]Um espécime teve um resultado discordante: Resultado equívoco em esfregaço endocervical no ensaio APTIMA COMBO 2/ Resultado positivo em esfregaço endocervical no ensaio APTIMA GC.

Tabela 7a: Resultados de esfregaços uretrais masculinos de participantes sintomáticos infectados ou não-infectados com N. gonorrhoeae de acordo com o estado de infecção do paciente

Estado de infecção do paciente	NAAT 1 (Ensaio APTIMA COMBO 2)		NAAT 2		Ensaio APTIMA GC	Total
	EM	UM	EM	UM	EM	
Infectado	+	+	+	+	+	164
Infectado	+	+	+	+	-	1
Infectado	+	+	+	-	+	3
Infectado	+	+	=	+	+	1
Infectado	+	-	+	+	+	2
Infectado	+	-	+	-	+	1
Não infectado	+	-	-	-	+	2
Não infectado	+	-	-	-	-	1
Não infectado	-	+	-	-	+	1
Não infectado	-	-	+	-	-	1
Não infectado	-	-	-	+	-	2
Não infectado	-	-	-	-	+	3
Não infectado	-	-	-	-	+	2
Não infectado	-	-	-	-	-	386
Não infectado	-	-	-	-	=	1
Não infectado	-	-	-	N/A	-	1
Não infectado	-	-	-	=	-	1
Não infectado	-	-	=	-	-	1
Não infectado	=	-	-	-	+	2
Total						**576**

N/A = espécime não obtido ou disponível para análise. O símbolo de igual (**=**) representa resultados equívocos ou indeterminados após repetição do teste. **EM** = esfregaço uretral masculino sintomático; **UM** = urina masculina.

Tabela 7b: Resultados de urina masculina de participantes infectados ou não-infectados com N. gonorrhoeae de acordo com o estado de infecção do paciente

Estado de infecção do paciente	NAAT 1 (Ensaio APTIMA COMBO 2)		NAAT 2		Ensaio APTIMA GC	Estado sintomático		Total
	EM	UM	EM	UM	UM	Sint.	Assint.	
Infectado	+	+	+	+	+	164	8	172
Infectado	+	+	+	+	+	1	0	1
Infectado	+	+	+	-	+	3	1	4
Infectado	+	+	=	+	+	1	0	1
Infectado	+	-	+	+	+	2	0	2
Infectado	+	-	+	-	-	1	1	2
Não infectado	+	+	-	-	+	0	1	1
Não infectado	+	-	-	-	-	2	13	15
Não infectado	+	-	-	-	-	1	0	1
Não infectado	-	+	-	-	+	1	0	1
Não infectado	-	+	-	-	-	0	1	1
Não infectado	-	-	+	-	-	1	1	2
Não infectado	-	-	-	+	-	2	2	4
Não infectado	-	-	-	-	+	3	1	4
Não infectado	-	-	-	-	-	2	1	3
Não infectado	-	-	-	-	+	0	3	3
Não infectado	-	-	-	-	-	386	691	1.077
Não infectado	-	-	-	-	-	1	2	3
Não infectado	-	-	-	N/A	-	1	4	5
Não infectado	-	-	-	=	-	1	4	5
Não infectado	-	-	=	-	-	1	1	2
Não infectado	-	=	-	-	-	0	1	1
Não infectado	N/A	-	-	-	-	0	1	1
Não infectado	=	-	-	-	-	2	6	8
Não infectado	=	-	-	-	-	0	2	2
Total						**576**	**745**	**1.321**

Sint. = sintomático; **Assint**. = assintomático. **N/A** = espécime não obtido ou disponível para análise. O símbolo de igual (**=**) representa resultados equívocos ou indeterminados após repetição do teste. **EM** = esfregaço uretral masculino; **UM** = urina masculina.

Tabela 7c: Resultados de esfregaços endocervicais feminino e urina de participantes infectados ou não-infectados com N. gonorrhoeae de acordo com o estado de infecção do paciente

Estado de infecção do paciente	NAAT 1 (Ensaio APTIMA COMBO 2)		NAAT 2		Ensaio APTIMA GC		Estado sintomático		Total
	EF	UF	EF	UF	EF	UF	Sint.	Assint.	
Infectado	+	+	+	+	+	+	43	16	59
Infectado	+	+	+	+	+	-	2	0	2
Infectado	+	+	+	-	+	+	2	1	3
Infectado	+	+	+	-	+	-	0	1	1
Infectado	+	+	+	N/A	+	+	1	0	1
Infectado	+	+	-	+	+	+	1	1	2
Infectado	+	+	-	-	+	+	1	1	2
Infectado	+	-	+	+	+	-	1	0	1
Infectado	+	-	+	-	+	+	0	1	1
Infectado	+	-	+	-	+	-	2	0	2
Infectado	-	+	+	+	-	+	1	0	1
Infectado	-	+	-	+	-	+	0	1	1
Infectado	-	+	-	+	=	+	0	1	1
Infectado	-	-	+	+	-	-	1	0	1
Não infectado	+	-	-	-	+	-	4	1	5
Não infectado	+	-	-	-	-	-	1	0	1
Não infectado	-	+	-	-	-	-	1	0	1
Não infectado	-	-	+	-	+	-	1	0	1
Não infectado	-	-	+	-	-	-	5	2	7
Não infectado	-	-	-	+	-	-	2	2	4
Não infectado	-	-	-	-	+	-	1	2	3
Não infectado	-	-	-	-	-	+	1	0	1
Não infectado	-	-	-	-	-	-	718	589	1.307
Não infectado	-	-	-	-	=	-	1	0	1
Não infectado	-	-	-	N/A	-	-	2	3	5
Não infectado	-	-	-	=	-	-	11	11	22
Não infectado	-	-	=	-	-	-	1	1	2
Não infectado	-	N/A	-	-	-	N/A	1	1	2
Não infectado	N/A	-	-	-	N/A	-	5	4	9
Não infectado	=	-	-	-	+	-	1	1	2
Total							**811**	**640**	**1.451**

Sint. = sintomático; **Assint**. = assintomático. **N/A** = espécime não obtido ou disponível para análise. O símbolo de igual (**=**) representa resultados equívocos ou indeterminados após repetição do teste. **EF** = esfregaço endocervical feminino; **UF** = urina feminina.

Tabela 7d: Resultados de esfregaços vaginais de participantes infectados ou não-infectados com N. gonorrhoeae de acordo com o estado de infecção do paciente

Estado de infecção do paciente	NAAT 1 (Ensaio APTIMA COMBO 2)		NAAT 2		Ensaio APTIMA GC		Estado sintomático		Total
	EF	UF	EF	UF	PVS	CVS	Sint.	Assint.	
Infectado	+	+	+	+	+	+	43	15	58
Infectado	+	+	+	+	-	+	1	0	1
Infectado	+	+	+	+	-	-	1	0	1
Infectado	+	+	+	+	N/A	+	0	1	1
Infectado	+	+	+	-	+	+	2	2	4
Infectado	+	+	+	N/A	+	+	1	0	1
Infectado	+	+	-	+	+	+	1	1	2
Infectado	+	+	-	-	+	+	1	1	2
Infectado	+	-	+	+	+	+	1	0	1
Infectado	+	-	+	-	+	+	2	1	3
Infectado	-	+	+	+	+	+	1	0	1
Infectado	-	+	-	+	+	+	0	1	1
Infectado	-	+	-	+	+	-	0	1	1
Infectado	-	-	+	+	-	-	1	0	1
Não infectado	+	-	-	-	-	-	5	1	6
Não infectado	-	+	-	-	-	-	1	0	1
Não infectado	-	-	+	-	+	+	1	0	1
Não infectado	-	-	+	-	-	-	5	2	7
Não infectado	-	-	-	+	+	+	0	1	1
Não infectado	-	-	-	+	-	-	2	1	3
Não infectado	-	-	-	-	+	+	2	1	3
Não infectado	-	-	-	-	+	-	3	1	4
Não infectado	-	-	-	-	-	+	3	1	4
Não infectado	-	-	-	-	-	-	696	577	1.273
Não infectado	-	-	-	-	-	N/A	0	1	1
Não infectado	-	-	-	-	-	=	0	1	1
Não infectado	-	-	-	-	N/A	-	16	9	25
Não infectado	-	-	-	-	N/A	N/A	1	0	1
Não infectado	-	-	-	N/A	-	-	2	2	4
Não infectado	-	-	-	N/A	N/A	-	0	1	1
Não infectado	-	-	-	=	-	-	11	10	21
Não infectado	-	-	-	=	-	N/A	0	1	1
Não infectado	-	-	=	-	-	-	1	1	2
Não infectado	-	N/A	-	-	-	-	0	1	1
Não infectado	-	N/A	-	-	N/A	N/A	1	0	1
Não infectado	N/A	-	-	-	-	-	5	4	9
Não infectado	=	-	-	-	-	-	1	1	2
Total							**811**	**640**	**1.451**

Sint. = sintomático; **Assint.** = assintomático. **N/A** = espécime não obtido ou disponível para análise. O símbolo de igual (**=**) representa resultados equívocos ou indeterminados após repetição do teste. **EF** = esfregaço endocervical feminino; **UF** = urina feminina; **PVS** = esfregaço vaginal colhido por paciente; **CVS** = esfregaço vaginal colhido pelo médico.

Tabela 7e: Resultados do estado de infecção de pacientes após estudo clínico de espécimes citológicos em base líquida PreservCyt para N. gonorrhoeae

Estado de infecção do paciente	Esfregaço endocervical		Estado sintomático	
	Ensaio APTIMA COMBO 2	Ensaio APTIMA GC	Sintomático	Assintomático
Infectado	Positivo	Positivo	7	6
Não-infectado	Negativo	Negativo	352	1.276
Não-infectado	Negativo	Positivo	0	5
Não-infectado	Equívoco	Positivo	0	1
Total			**359**	**1.288**

Distribuição RLU de Controlos APTIMA

A distribuição de RLU para o controlo positivo APTIMA, GC / controlo negativo, CT e o controlo positivo APTIMA, CT / controlo negativo, GC de todos os testes do ensaio APTIMA GC executados durante os estudos clínicos dos espécimes é apresentada na Tabela 8.

Tabela 8: Distribuição de RLU dos controlos APTIMA durante os estudos de espécimes clínicos que incluíram esfregaços endocervicais, vaginais e uretrais masculinos, espécimes de urina masculina e feminina e espécimes citológicos líquidos em PreservCyt

Controlo	Estatística	RLU (x1.000)	
		Estudo clínico de esfregaços e espécimes de urina	Estudo clínico em espécimes citológicos líquidos em PreservCyt
Controlo positivo, GC / Controlo negativo, CT	N	193	218
	Média	5.048	4.561
	DP	1.071	1.295
	Máxima	6.765	6.791
	Percentil 75	5.763	5.450
	Mediana	5.175	4.859
	Percentil 25	4.645	3.804
	Mínima	229	158
Controlo positivo, CT / Controlo negativo, GC	N	193	218
	Média	2,15	2,60
	DP	2,20	2,80
	Máxima	20	29
	Percentil 75	2	3
	Mediana	2	2
	Percentil 25	1	2
	Mínima	0	1

Estudo de Precisão

A precisão do ensaio APTIMA GC (ou seja, a reprodutibilidade), foi avaliada em dois centros clínicos externos e na Gen-Probe. A precisão do ensaio APTIMA GC foi avaliada entre três lotes de kits de ensaio APTIMA GC, três locais de estudo, seis operadores e 108 testes do ensaio APTIMA GC. Dois operadores em cada um dos três locais de ensaio realizaram um total de seis testes do ensaio APTIMA GC por lote de kit, num total de 36 testes por lote de kit. Cada teste foi constituído por um painel de precisão de 12 membros contendo 0 to 2433 fg/ensaio de rRNA de GC. A reprodutibilidade foi estabelecida utilizando meio de transporte de esfregaços misturado com rRNA. A reprodutibilidade ao testar os espécimes de esfregaços contendo o organismo alvo não foi determinada. A Tabela 9 apresenta os dados de precisão de RLU em termos de média, desvio padrão, coeficiente de variação (CV) e concordância percentual com os resultados esperados para cálculos de variabilidade entre locais, entre operadores, entre lotes, entre testes e intrateste.

Tabela 9: Dados de precisão do ensaio APTIMA GC utilizando um painel de precisão de 12 membros contendo 0 to 2.433 fg/ensaio de rRNA de GC

Concentração	N	RLU média (x1.000)	% Concd.	Intrateste		Entre Locais		Entre Lotes		Entre Operadores		Entre Testes	
				DP RLU (x1.000)	CV (%)	DP RLU (x1.000)	CV (%)	DP RLU (x1.000)	CV (%)	DP RLU (x1.000)	CV (%)	DP RLU (x1.000)	CV (%)
Neg (0 fg/mL)	540	11,7	99,8	233,3	N/A	0	N/A	0	N/A	4,3	N/A	0	N/A
Baixo (608 - 625 fg/mL)	324	5.574,4	99,7	617,2	11,1	189,2	3,4	518,1	9,3	311,3	5,6	527,4	9,5
Intermédio (6.082 fg/mL)	108	6.502,6	100	138,8	2,1	0	0,0	481,9	7,4	514,8	7,9	579,4	8,9
Elevado (12.500 fg/mL)	324	6.786,0	100	270,3	4,0	0	0,0	581,3	8,6	410,7	6,1	647,1	9,5

DP = desvio padrão; **CV(%)** = coeficiente de variação em percentagem; **% Concd.** = concordância percentual. **N/A** = não aplicável para analitos negativos.
Nota: A variabilidade de alguns factores pode ser numericamente negativa, o que pode ocorrer se a variabilidade devida a esses factores for muito pequena. Quando isto ocorre, a variabilidade medida com DP e %CV é definida como zero (12).

A precisão intralaboratorial dos espécimes citológicos em base líquida PreservCyt com o ensaio APTIMA GC foi determinada misturando aos frascos de PreservCyt 20 CFU de GC por frasco (0,1 CFU por reacção) e 100 CFU de GC por frasco (0,5 reacção). Os frascos contendo 10.000 CFU de GC por frasco (50 CFU por reacção) e os frascos de PreservCyt não misturados foram testados como controlos positivos e negativos. Dez frascos misturados com cada nível de CFU e dez frascos não misturados foram divididos entre dois operadores. Os operadores agitaram os frascos no vórtex e depois transferiram 14 alíquotas (1,0 mL cada) por frasco para 14 tubos de transferência APTIMA, conforme indica o folheto informativo do kit de transferência de amostras APTIMA. Os operadores desconheciam os títulos das amostras. Cada uma das amostras citológicas em STM foi testada uma vez no ensaio APTIMA GC. Realizou-se um total de cinco testes ao longo de um período de cinco dias, para 140 resultados nos níveis de 0,1, 0,5 e 50 CFU. Verificaram-se 136 resultados válidos e 4 resultados inválidos para o painel de controlo negativo. Os resultados inválidos deveram-se a uma má colocação de uma TTU no Leader HC+. Os resultados são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10: Dados de precisão intralaboratorial do ensaio APTIMA GC para PreservCyt utilizando um painel de precisão de 4 membros contendo 0 to 500 CFU/mL de células de GC

Membro do Painel	CFU/mL PreservCyt	CFU/ rxn	N	Concor-daram	% Concd.	RLU média (x1.000)	Intraoperador		Entre dias		Entre Operadores		Total	
							DP (x1.000)	CV (%)	DP (x1.000)	CV (%)	DP (x1.000)	CV (%)	DP (x1.000)	CV (%)
A	1	0,1	140	39	27,9	313,7	758,3	241,7	132,5	42,2	0,0	0,0	769,8	245,4
B	5	0,5	140	113	80,7	1.211,1	1.031,3	85,2	169,8	14,0	150,4	12,4	1.056,0	87,2
C	500	50	140	140	100	5.636,8	220,7	3,9	135,7	2,4	0,0	0,0	259,1	4,6
D	0	0	136*	136	100	1,2	0,5	N/A	0	N/A	0,3	N/A	0,6	N/A

* Verificaram-se quatro resultados inválidos devido a uma má colocação de uma TTU no Leader HC+.

Nota: A variabilidade de alguns factores pode ser numericamente negativa, o que pode ocorrer se a variabilidade devida a esses factores for pequena. Quando isto ocorre, a variabilidade medida com DP e %CV é definida como zero (12). N/A = não aplicável para membros do painel negativos. Operador = teste. As amostras com resultados discordantes foram incluídas na análise de variabilidade de sinal.

Desempenho analítico nos Sistemas DTS

Consulte *Desempenho analítico no Sistema TIGRIS DTS* após a secção *Concordância dos espécimes clínicos no Sistema TIGRIS DTS* para obter o desempenho analítico específico do Sistema TIGRIS DTS.

Consulte *Desempenho analítico no Sistema PANTHER* para obter o desempenho analítico específico do Sistema PANTHER.

Sensibilidade Analítica

A sensibilidade analítica para *N. gonorrhoeae* (limites de detecção) foi determinada por comparação directa entre diluições de 51 isolados clínicos distintos em cultura celular e no ensaio APTIMA GC. A sensibilidade clínica indicada para o ensaio é de 50 CFU/ensaio (362 CFU/esfregaço, 250 CFU/mL urina e 487,5 CFU/mL de espécime citológico em base líquida PreservCyt).

Especificidade Analítica

No total, foram avaliados 154 isolados de cultura utilizando o ensaio APTIMA GC. Estes isolados incluíram 86 organismos que podem ser isolados das vias urinárias e 68 organismos adicionais que representam uma secção transversal filogenética dos organismos. Os organismos testados incluíram bactérias, fungos, leveduras, parasitas e vírus. Todos os organismos, excepto *C. psittaci, C. pneumoniae, U. urealyticum* e os vírus foram testados a 1,0 x10^6 células/ensaio em meio de transporte de urina KOVA-Trol e 60 organismos foram testados em meio de transporte de esfregaços. Os organismos Chlamydia e Neisseria foram testados em meios de solução PreservCyt. *C. psittaci* VR601 foi testado a 8,0 x 10^4 células/ensaio e *C. psittaci* VR125 foi testado a 1,0 x 10^5 células/ensaio. *C. pneumoniae* foi testado a 4,0 x 10^3 células/ensaio e *U. urealyticum* foi testado a 6,7 x 10^6 células/ensaio. Os virus foram testados da seguinte forma: (a) vírus herpes simplex I: 2,5 x 10^4 $TCID_{50}$/ensaio, (b) vírus herpes simplex II: 6,0 x 10^4 $TCID_{50}$/ensaio, (c) papilomavírus humano 16: 2,9 x 10^6 cópias de DNA/ensaio e (d) citomegalovírus: 4,8 x 10^5 células/ensaio. A lista dos organismos testados é indicada na Tabela 11.

Tabela 11: Especificidade Analítica

Organismo	Organismo	Organismo
Achromobacter xerosis	*Escherichia coli*	*Neisseria mucosa (3)*
Acinetobacter calcoaceticus	*Flavobacterium meningosepticum*	*Neisseria sicca (3)*
Acinetobacter lwoffi	*Fusobacterium nucleatum*	*Neisseria subflava (14)*
Actinomyces israelii	*Gardnerella vaginalis*	*Neisseria perflava*
Actinomyces pyogenes	*Gemella haemolysans*	*Neisseria polysaccharea*
Aerococcus viridans	*Haemophilus ducreyi*	*Paracoccus denitrificans*
Aeromonas hydrophila	*Haemophilus influenzae*	*Peptostreptococcus anaerobius*
Agrobacterium radiobacter	Herpes simplex virus I	*Peptostreptococcus productus*
Alcaligenes faecalis	Herpes simplex virus II	*Plesiomonas shigelloides*
Bacillus subtilis	Papilomavírus humano 16	*Propionibacterium acnes*
Bacteriodes fragilis	*Kingella dentrificans*	*Proteus mirabilis*
Bacteriodes ureolyticus	Kingella kingae	*Proteus vulgaris*
Bifidobacterium adolescentis	*Klebsiella oxytoca*	*Providencia stuartii*
Bifidobacterium brevi	*Klebsiella pneumoniae*	*Pseudomonas aeruginosa*
Branhamella catarrhalis	*Lactobacillus acidophilus*	*Pseudomonas fluorescens*
Brevibacterium linens	*Lactobacillus brevis*	*Pseudomonas putida*
Campylobacter jejuni	*Lactobacillus jensonii*	*Rahnella aquatilis*
Candida albicans	*Lactobacillus lactis*	*Rhodospirillum rubrum*
Candida glabrata	*Legionella pneumophila (2)*	*Saccharomyces cerevisiae*
Candida parapsilosis	*Leuconostoc paramensenteroides*	*Salmonella minnesota*
Candida tropicalis	*Listeria monocytogenes*	*Salmonella typhimurium*
Chlamydia pneumoniae	*Micrococcus luteus*	*Serratia marcescens*
Chlamydia psittaci (2)	*Moraxella lacunata*	*Staphylococcus saprophyticus*
Chromobacterium violaceum	*Moraxella osloensis*	*Staphylococcus aureus*
Citrobacter freundii	*Morganella morganii*	*Staphylococcus epidermidis*
Clostridium perfringens	*Mycobacterium smegmatis*	*Streptococcus agalactiae*
Corynebacterium genitalium	*Mycoplasma genitalium*	*Streptococcus bovis*
Corynebacterium xerosis	*Mycoplasma hominis*	*Streptococcus mitis*
Cryptococcus neoformans	*N. meningitidis Serogroup A*	*Streptococcus mutans*
Cytomegalovirus	*N. meningitidis Serogroup B*	*Streptococcus pneumoniae*
Deinococcus radiodurans	*N. meningitidis Serogroup C (4)*	*Streptococcus pyogenes*
Derxia gummosa	*N. meningitidis Serogroup D*	*Streptococcus salivarius*
Eikenella corrodens	*N. meningitidis Serogroup Y*	*Streptococcus sanguis*
Enterobacter aerogenes	*N. meningitidis Serogroup W135*	*Streptomyces griseinus*
Enterobacter cloacae	*Neisseria cinerea (4)*	*Trichomonas vaginalis*
Entercoccus avium	*Neisseria dentrificans*	*Ureaplasma urealyticum*
Entercoccus faecalis	*Neisseria elongata (3)*	*Vibrio parahaemolyticus*
Entercoccus faecium	*Neisseria flava*	*Yersinia enterocolitica*
Erwinia herbicola	*Neisseria flavescens (2)*	
Erysipelothrix rhusiopathiae	*Neisseria lactamica (9)*	

(n) = número de estirpes testadas.

Todos os organismos testados deram resultados negativos no ensaio APTIMA GC.

Substâncias Interferentes

Foram introduzidas em esfregaços, espécimes citológicos em base líquida PreservCyt e/ou espécimes de urina as seguintes substâncias interferentes: 10% sangue, geleia contraceptiva, espermicida, hidratante, anestésico hemorroidal, óleo de corpo, pó, creme antifúngico, lubrificantes vaginais, spray feminino e leucócitos (1,0 x 10^6 células/mL). Foram introduzidas em espécimes de urina as seguintes substâncias interferentes: 30% de sangue, analitos de urina, proteínas, glucose, cetonas, bilirrubina, nitrato, urobilinogénio, pH 4 (ácido), pH 9 (alcalino), leucócitos (1,0 x 10^6 células/mL), restos celulares, vitaminas, minerais, paracetamol, ácido acetilsalicílico e ibuprofeno. Todos foram testados quanto a uma potencial interferência no ensaio na ausência e na presença de GC a um equivalente de rRNA estimado em a 50 células de GC/ensaio (250 fg/ensaio). Os equivalentes rRNA foram calculados com base no tamanho do genoma e a taxa estimada média/célula DNA:RNA de cada organismo.

Nenhuma interferência foi observada com nenhuma das substâncias testadas. Não foram observados inibidores da amplificação no ensaio APTIMA GC.

Recuperação

Adicionou-se *Escherichia coli, Gardnerella vaginalis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bacteroides ureolyticus* e *Staphylococcus epidermidis* (1,0 x 10^8 células/ensaio) a amostras contendo rRNA equivalente a aproximadamente 50 células de GC (250 fg). Estas adições não interferiram na amplificação e detecção de rRNA de GC pelo ensaio APTIMA GC.

Estudos de estabilidade dos espécimes

A. Esfregaços e espécimes de urina

Os dados que sustentam as condições recomendadas de envio e armazenamento de esfregaços endocervicais, uretrais e vaginais foram gerados a partir de amostras de esfregaços negativos agrupados. As amostras agrupadas foram misturadas com GC a uma concentração final de aproximadamente 50 CFU por reacção. As amostras misturadas foram mantidas a -70 °C, -20 °C, 4 °C e 30 °C. As amostras foram testadas em duplicado nos dias 0, 20, 77 e 117. Todas as condições de teste deram resultados positivos para GC em todos os momentos e a todas as temperaturas.

Os dados que sustentam as condições recomendadas de envio e armazenamento de amostras de urina foram gerados a partir de amostras negativas de urina de ambos os sexos. As amostras de urina foram misturadas com GC a uma concentração final de aproximadamente 100 CFU por reacção. As amostras foram mantidas a 30 °C durante 24 horas antes de ser adicionadas ao meio de transporte de urina (Urine Transport Medium, UTM). As amostras de UTM foram depois mantidas entre 4 °C e 30 °C e testadas em triplicado aos dias 1, 14, 32 e 35. As amostras de UTM foram também armazenadas a -20 °C e -70 °C e testadas em triplicado aos dias 1, 35 e 109. Todos os replicados deram resultados positivos para GC com as amostras de UTM a 4 °C e -70 °C. Quando as amostras de UTM foram mantidas a 30 °C, 94% dos replicados deram resultados positivos para GC ao dia 35. Quando as amostras de UTM foram mantidas a -20 °C, 98% dos replicados deram resultados positivos para GC ao dia 109.

B. Espécimes citológicos em base líquida PreservCyt

Os dados que sustentam as condições recomendadas de envio e armazenamento de espécimes citológicos em base líquida PreservCyt foram gerados a partir de amostras negativas processadas e não processadas de líquido citológico. Quanto às amostras não processadas, foram testados quatro grupos de amostras de solução PreservCyt após serem armazenados no frasco de solução PreservCyt Cytyc. Cada grupo de espécimes foi misturado com 50-100 CFU de GC/ensaio, mantido a 2 °C, 10 °C e 30 °C e depois testado no momento basal e aos dias 5, 7, 8, 14, 18, 21, 25 e 36. Todas as amostras misturadas deram resultados positivos para GC em todos os momentos e a todas as temperaturas.

Quanto às amostras processadas, foram utilizados quatro grupos de amostras de solução PreservCyt para determinar a estabilidade dos espécimes processados entre 2 °C e 30 °C. Cada grupo de amostras negativas foi misturado com 50-100 CFU de GC/ensaio e depois testado no momento basal. Antes do processamento, as amostras em solução PreservCyt foram conservadas a 30 °C durante sete (7) dias para simular o intervalo de tempo entre a colheita das amostras, o procedimento citológico e o envio para um laboratório de análises microbiológicas. Após sete dias a 30 °C, foram transferidas alíquotas de 1 mL de cada conjunto para um tubo de transferência de espécimes APTIMA, que foram testadas no momento basal antes de as colocar a 2 °C, 10 °C e 30 °C. As amostras processadas foram depois testadas aos 17 dias, armazenadas a 30 °C, e aos 36 dias, armazenadas entre 2 °C e 10 °C. Todas as amostras misturadas deram resultados positivos para GC em todos os momentos e a todas as temperaturas.

Os dados que sustentam condições de armazenamento mais prolongadas foram gerados a partir de quatro grupos de amostras de solução PreservCyt processadas negativas, testadas a temperaturas inferiores à da congelação. Cada grupo foi misturado com 50-100 CFU de GC/ensaio e depois testado no momento basal. Cada grupo foi primeiro colocado a 30 °C durante 14 dias e depois armazenado a -20 °C ou -70 °C durante 106 dias. Todas as amostras misturadas deram resultados positivos para GC em todos os momentos e a todas as temperaturas.

C. Estudo Adicional de Estabilidade de Espécimes Congelado (a -20 °C)

Os dados que sustentam as condições recomendadas de armazenamento a -20 °C para esfregaços endocervicais, esfregaços uretrais, esfregaços vaginais, urina feminina, urina masculina e espécimes citológicos em base líquida PreservCyt foram geradas utilizando 90 espécimes para cada tipo com resultados negativos, em que 30 espécimes foram misturados com GC a 50 CFU por reacção; 30 espécimes foram misturados com GC a 5 CFU por reacção, respectivamente e 30 espécimes não foram misturados. Os espécimes foram armazenados a -20 °C e testados aos dias 0, 200 e 400. Todos os espécimes misturados atingiram o critério de aceitação de 95% de concordância com os resultados esperados.

Concordância dos espécimes clínicos no Sistema TIGRIS DTS

Concordância do Sistema TIGRIS DTS

A concordância entre os resultados do ensaio APTIMA GC gerados no Sistema TIGRIS DTS totalmente automatizado e nos Sistemas DTS semi-automatizados foi avaliada testando esfregaços endocervicais, esfregaços uretrais masculinos, urina feminina e masculina, esfregaços vaginais e espécimes citológicos em base líquida PreservCyt. Todos os espécimes clínicos foram testados individualmente com o ensaio APTIMA GC no Sistema TIGRIS DTS e nos Sistemas DTS na Gen-Probe. A ordem de análise não foi aleatória. Os espécimes identificados para inclusão foram testados no Sistema TIGRIS DTS e, depois, nos Sistemas DTS.

Estudo de concordância de espécimes clínicos — esfregaços endocervicais, esfregaços uretrais masculinos, urina feminina e masculina, esfregaços vaginais e espécimes citológicos em base líquida PreservCyt

Participantes do sexo feminino e masculino, utentes de clínicas de DST, planeamento familiar e OB/GINEC de oito locais geograficamente distintos, com prevalência baixa a elevada de GC, contribuíram com esfregaços endocervicais, esfregaços uretrais masculinos, urina masculina e feminina, esfregaços vaginais e espécimes citológicos em base líquida PreservCyt. Os espécimes foram transferidos directamente para a Gen-Probe para análise. Na Gen-Probe, os esfregaços vaginais, os esfregaços uretrais masculinos, e os espécimes de urina masculina e feminina foram primeiro rastreados com o ensaio APTIMA COMBO 2 no Sistema TIGRIS DTS. Os esfregaços vaginais e os espécimes citológicos em base líquida PreservCyt foram rastreados primeiro com o ensaio APTIMA COMBO 2 nos Sistemas DTS. Os espécimes com resultados finais inválidos ou equívocos não foram seleccionados no Estudo de concordância de espécimes clínicos em APTIMA GC.

Cento e vinte e nove esfregaços femininos (70 endocervicais e 59 vaginais), 133 esfregaços uretrais masculinos, 72 espécimes de urina feminina, 130 de urina masculina e 51 espécimes citológicos em base líquida PreservCyt com resultados positivos e negativos no ensaio APTIMA COMBO 2 foram seleccionados para análises de comparação entre o Sistema TIGRIS DTS e os Sistemas DTS para o ensaio APTIMA GC. A maioria dos espécimes (88 esfregaços femininos, 93 esfregaços masculinos, 47 espécimes de urina feminina, 70 de urina masculina e 34 espécimes citológicos em base líquida PreservCyt) incluídos para análises de comparação provinham de indivíduos sintomáticos. Os espécimes com resultados iniciais inválidos ou equívocos foram depois testados utilizando o mesmo sistema que tinha gerado o resultado. Três espécimes de urina feminina, 1 esfregaço vaginal e 1 esfregaço uretral masculino apresentaram resultados iniciais equívocos nos Sistemas DTS; após repetição do teste, todos deram resultados válidos. Um espécime de urina masculina e outro de urina feminina apresentaram resultados iniciais inválidos no Sistema TIGRIS DTS; após repetição do teste, ambos os resultados foram válidos.

A Tabela 12 mostra as concordâncias positivas, negativas e globais para todos os resultados emparelhados para cada tipo de espécime por estado sintomático. Os esfregaços femininos (esfregaços endocervicais e vaginais combinados) estão desequilibrados relativamente a amostras positivas e negativas de participantes sintomáticas, mas a concordância global para participantes sintomáticas foi de 100%, para participantes assintomáticas foi de 97,6% (40/41) e, para, “todas” (sintomáticas e assintomáticas combinadas) a concordância global foi de 99,2% (128/129). Quanto aos esfregaços uretrais masculinos, a concordância global para participantes sintomáticos, assintomáticos e “todos” foi de 100%. Relativamente aos espécimes de urina feminina, a concordância global para participantes sintomáticas foi de 100%, para participantes assintomáticas foi de 96,0% (24/25) e para “todas” foi de 98,6% (71/72).

Relativamente aos espécimes de urina masculina, a concordância global para participantes sintomáticos foi de 98,6% (69/70), para participantes assintomáticos foi de 100% e para "todos" foi de 99,2% (129/130). Quanto aos espécimes citológicos em base líquida PreservCyt, a concordância global para participantes sintomáticos, assintomáticos e "todos" foi de 100%. Devido ao número relativamente mais baixo de espécimes de participantes assintomáticos, estes resultados podem não ser generalizáveis ao teste com o ensaio APTIMA GC no Sistema TIGRIS DTS com espécimes de participantes assintomáticos.

Consulte a Tabela 4 para obter as estimativas de desempenho do APTIMA GC relativamente a esfregaços endocervicais, esfregaços vaginais, esfregaços uretrais masculinos e espécimes de urina de ambos os sexos e a Tabela 5a para espécimes citológicos em base líquida PreservCyt testados nos Sistemas DTS. Seria de esperar que as estimativas do desempenho clínico no Sistema TIGRIS DTS com esfregaços endocervicais, esfregaços vaginais, esfregaços uretrais masculinos, urina masculina e feminina e espécimes citológicos em base líquida PreservCyt fossem semelhantes, dados os resultados de concordância.

Tabela 12: Estudo de concordância de espécimes clínicos: concordâncias positivas, negativas e globais por estado sintomático

Symptom	Espécime	Sexo	n	DTS+ TIGRIS+	DTS+ TIGRIS-	DTS- TIGRIS+	DTS- TIGRIS-	Concordância % positiva (IC de 95%)	Concordância % negativa (IC de 95%)	Concordância % global (IC de 95%)
Sint.	Esfregaço	Feminino*	88	55	0	0	33	100 (93,5 - 100)	100 (89,4 - 100)	100 (95,9 - 100)
		Masculino	93	66	0	0	27	100 (94,6 - 100)	100 (87,2 - 100)	100 (96,1 - 100)
	Urina	Feminino	47	24	0	0	23	100 (85,8 - 100)	100 (85,2 - 100)	100 (92,5 - 100)
		Masculino	70	60	1	0	9	98,4 (91,2 - 100)	100 (66,4 - 100)	98,6 (92,3 - 100)
	PreservCyt	Feminino	34	28	0	0	6	100 (87,7 - 100)	100 (54,1 - 100)	100 (89,7 - 100)
Assint.	Esfregaço	Feminino*	41	23	0	1[1]	17	100 (85,2 - 100)	94,4 (72,7 - 99,9)	97,6 (87,1 - 99,9)
		Masculino	40	7	0	0	33	100 (59,0 - 100)	100 (89,4 - 100)	100 91,2 - 100)
	Urina	Feminino	25	9	0	1	15	100 (66,4 - 100)	93,8 (69,8 - 99,8)	96,0 (79,6 - 99,9)
		Masculino	60	5	0	0	55	100 (47,8 - 100)	100 (93,5 - 100)	100 (94,0 - 100)
	PreservCyt	Feminino	17	12	0	0	5	100 (73,5 - 100)	100 (47,8 - 100)	100 (80,5 - 100)

"+" denota um resultado positivo, "-"um resultado negativo, IC = intervalo de confiança.

*Amostras de esfregaços endocervicais e vaginais combinadas.

[1]Uma discordância em esfregaço vaginal.

Tabela 12: Estudo de concordância de espécimes clínicos: concordâncias positivas, negativas e globais por estado sintomático (continua)

Symptom	Espécime	Sexo	n	DTS+ TIGRIS+	DTS+ TIGRIS-	DTS- TIGRIS+	DTS- TIGRIS-	Concor-dância % positiva (IC de 95%)	Concor-dância % negativa (IC de 95%)	Concor-dância % global (IC de 95%)
Tudo	Esfregaço	Feminino*	129	78	0	1[1]	50	100 (95,4 - 100)	98,0 (89,6 - 100)	99,2 (95,8 - 100)
		Masculino	133	73	0	0	60	100 (95,1 - 100)	100 (94,0 - 100)	100 (97,3 - 100)
	Urina	Feminino	72	33	0	1	38	100 (89,4 - 100)	97,4 (86,5 - 99,9)	98,6 (92,5 - 100)
		Masculino	130	65	1	0	64	98,5 (91,8 - 100)	100 (94,4 - 100)	99,2 (95,8 - 100)
	PreservCyt	Feminino	51	40	0	0	11	100 (91,2 - 100)	100 (71,5 - 100)	100 (93,0 - 100)

"+" denota um resultado positivo, "-"um resultado negativo, IC = intervalo de confiança.

*Amostras de esfregaços endocervicais e vaginais combinadas.

[1]Uma discordância em esfregaço vaginal.

Estudo de Precisão

O efeito de diversos factores sobre a variabilidade do desempenho do ensaio APTIMA GC no Sistema TIGRIS DTS foi avaliado utilizando painéis de reprodutibilidade de DST de 12 membros. Os membros do painel continham 0 a 250.000 fg de rRNA de GC/ensaio. O painel incluiu membros do painel com concentrações de GC próximas da sensibilidade analítica indicada de 250 fg de rRNA de GC/ensaio.

Os painéis foram testados num local de teste externo e na Gen-Probe, utilizando dois lotes de reagentes do ensaio APTIMA GC. Na Gen-Probe, 2 operadores realizaram cada um 3 listas de trabalho válidas por lote de reagentes, em cada um de 2 instrumentos do Sistema TIGRIS DTS. No local de teste externo, 2 operadores realizaram cada um 3 listas de trabalho válidas por lote de reagentes, em 1 instrumento do Sistema TIGRIS DTS. Uma lista de trabalho consistiu em controlos do teste e seis painéis de 12 membros. As amostras com resultados iniciais inválidos ou equívocos de listas de trabalho de ensaios válidos não voltaram a ser testadas. Onze amostras apresentaram resultados finais inválidos e foram excluídas das análises de reprodutibilidade.

A reprodutibilidade foi determinada calculando a concordância entre os resultados finais do ensaio e os resultados esperados para cada membro do painel. A reprodutibilidade foi também avaliada calculando o DP e o coeficiente de variação (CV) do sinal relativamente a locais, operadores, lotes e listas de trabalho. Não se calcularam os CV para membros do painel negativos para GC devido à existência de valores baixos do sinal, que poderiam, em teoria, ser iguais a zero. A Tabela 13 mostra os resultados da reprodutibilidade. Todos os resultados do ensaio APTIMA GC no Sistema TIGRIS DTS concordaram com os resultados esperados para os membros do painel contendo 0, 250, 25.000 e 250.000 fg de rRNA de GC/ensaio. No caso dos membros do painel contendo 2.500 fg de rRNA de GC/ensaio, a concordância com os resultados esperados foi de 99,8%. Os valores de CV foram iguais ou inferiores a 9,0%. Estes dados indicam uma boa reprodutibilidade do ensaio APTIMA GC com o Sistema TIGRIS DTS.

Tabela 13: Dados de Precisão do Sistema TIGRIS DTS

Conc (fg rRNA por ensaio)	n	RLU média (x1.000)	% Concd	Entre Locais		Entre Operadores		Entre Lotes		Entre listas de trabalho		Intra-lista de trabalho	
				DP (x1.000)	CV (%)	DP[1] (x1.000)	CV (%)	DP (x1.000)	CV (%)	DP (x1.000)	CV (%)	DP (x1.000)	CV (%)
0	859[2]	4,6	100	1,7	N/A	0,0	N/A	0,3	N/A	0,7	N/A	2,7	N/A
250	429[3]	4.148	100	236	5,7	170	4,1	212	5,1	94,9	2,3	222	5,3
2.500	429[4]	5.361	99,8	275	5,1	145	2,7	273	5,1	25,1	0,5	482	9,0
25.000	430[5]	5.871	100	325	5,5	163	2,8	303	5,2	106	1,8	176	3,0
250.000	431[6]	6.037	100	317	5,2	167	2,8	303	5,0	126	2,1	186	3,1

Concd = concordância, Conc = concentração, CV = coeficiente de variação, N/A = não aplicável a amostras negativas, RLU = unidades relativas de luz (Relative Light Units), DP = desvio padrão.

[1] Os valores do DP e do CV estão definidos como 0 e 0,0%, respectivamente, de acordo com o modelo de efeitos aleatórios, se a variabilidade devido a esta fonte relativamente a erros aleatórios e/ou à variação de outras fontes for numericamente negativa.

[2] 4 amostras foram excluídas desta análise devido a resultados finais inválidos. Além disso, faltou numa lista de trabalho 1 replicado de cada um dos membros de um painel negativo para GC.

[3] 3 amostras foram excluídas desta análise devido a resultados finais inválidos.

[4] 2 amostras foram excluídas desta análise devido a resultados finais inválidos. Ademais, faltou em duas listas de trabalhos 1 replicado de cada um dos membros de um painel com 2.500 fg rRNA de GC/ensaio e uma lista de trabalho incluiu um replicado adicional de um membro do painel com 2.500 fg rRNA de GC/ensaio.

[5] 2 amostras foram excluídas desta análise devido a resultados finais inválidos. Além disso, uma lista de trabalho incluiu 1 replicado adicional de um membro de um painel com 25.000 fg rRNA de GC/ensaio. Na mesma lista de trabalho faltou 1 replicado de outro membro de um painel com 25.000 fg rRNA de GC/ensaio.

[6] Numa lista de trabalho faltou 1 replicado de um membro de um painel com 250.000 fg rRNA de GC/ensaio.

Nota: As amostras com resultados inválidos no teste foram excluídas. A análise da variabilidade do sinal inclui amostras com resultados discordantes.

Desempenho analítico no Sistema TIGRIS DTS

Consulte *Desempenho analítico no Sistema PANTHER* para obter o desempenho analítico específico do Sistema PANTHER.

Estudo de Equivalência de Sensibilidade Analítica

Os painéis de sensibilidade em grupos de esfregaços endocervicais, grupos de espécimes vaginais, grupos de espécimes de urina e grupos de espécimes citológicos líquidos em PreservCyt foram preparados a uma concentração de rRNA de GC de 250 fg/ensaio, tendo sido testados 60 replicados no Sistema TIGRIS DTS. A percentagem de positividade (IC de 95%) no Sistema TIGRIS DTS para esfregaços endocervicais foi de 100% (95,1 - 100), para esfregaços vaginais foi de 100% (95,1 - 100), para espécimes de urina foi de 100% (95,1 - 100), e para espécimes citológicos em base líquida PreservCyt foi de 100% (95,1 - 100).

Estudo do painel clínico misturado com rRNA de GC

O estudo do painel clínico misturado com rRNA de GC avaliou a concordância entre os dois sistemas utilizando seis painéis clínicos de GC preparados na Gen-Probe a que se misturou 0 a 250.000 fg rRNA de GC/ensaio. Os painéis clínicos de GC foram criados a partir de esfregaços endocervicais, esfregaços vaginais, esfregaços uretrais, urina masculina, urina feminina e espécimes citológicos em base líquida PreservCyt que tinham apresentado resultados negativos com o ensaio APTIMA GC, nos Sistemas DTS, quando testados na Gen-Probe. Os espécimes negativos foram agrupados por tipo de espécime, misturados ou não com rRNA de GC e alioquotados como replicados de cada membro do painel. Foram combinados replicados de membros de seis painéis, com diferentes concentrações de rRNA misturado, para criar um painel clínico para cada tipo de espécime. Cada painel continha um total de 132 replicados.

Os dados iniciais em urina masculina e feminina mostram que alguns membros de painéis que continham rRNA a uma concentração inferior à sensibilidade analítica indicada deram resultados negativos inesperados no Sistema TIGRIS DTS. Foram realizados dois estudos de seguimento para demonstrar e confirmar a concordância com os resultados esperados em painéis de urina masculina ou feminina com mistura de rRNA. O desenho original do estudo combinava amostras negativas num só grupo principal. O desenho do estudo de seguimento para espécimes de urina masculina e feminina foi alterado. Os espécimes foram aliquotados em minigrupos negativos confirmados para formar os painéis positivos e negativos. Para cada painel, foram criados 138 replicados.

A Tabela 14 mostra as concordâncias percentuais para cada nível de rRNA nos esfregaços endocervicais, vaginais, uretrais, em urina masculina, em urina feminina e nos espécimes citológicos em base líquida PreservCyt, respectivamente, com os resultados de GC esperados para o Sistema TIGRIS DTS e para os Sistemas DTS. A concentração entre 1 ordem de grandeza abaixo a 3 ordens de grandeza acima de 250 fg de rRNA de GC/ensaio. A Tabela 14 indica também as concordâncias percentuais globais do estudo do painel clínico entre o Sistema TIGRIS DTS e os Sistemas DTS.

Tabela 14: Estudo de concordância do painel clínico misturado com rRNA de GC

Espécime		Membro do Painel	Concentração (fg rRNA/ensaio)	Réplicas	% Concor-dância TIGRIS	% Concor-dância DTS	Concordância % global entre TIGRIS e DTS (IC de 95%)
Esfregaço	Endocervical	Sem alvo	0	12	100	100	100 (97,2 - 100)
		Muito baixo	25	30	100	100	
		Baixa	250	30	100	100	
		Médio	2.500	30	100	100	
		High	250.000	30	100	100	
	Vaginal	Sem alvo	0	12	100	100	100 (97,2 - 100)
		Muito baixo	25	29*	100	100	
		Baixa	250	30	100	100	
		Médio	2.500	30	100	100	
		High	250.000	30	100	100	
	Uretral	Sem alvo	0	12	100	100	100 (97,2 - 100)
		Muito baixo	25	30	100	100	
		Baixa	250	30	100	100	
		Médio	2.500	30	100	100	
		High	250.000	30	100	100	
Urina masculina	Estudo inicial	Sem alvo	0	12	100	100	91,7 (85,6 - 95,8)
		Muito baixo	25	30	63,3 (19/30)	100	
		Baixa	250	30	100	100	
		Médio	2.500	30	100	100	
		High	250.000	30	100	100	
	Seguimento 1	Sem alvo	0	18	100	100	100 (97,4 - 100)
		Muito baixo	25	30	100	100	
		Baixa	250	30	100	100	
		Médio	2.500	30	100	100	
		High	250.000	30	100	100	
	Seguimento 2	Sem alvo	0	18	100	100	100 (97,4 - 100)
		Muito baixo	25	30	100	100	
		Baixa	250	30	100	100	
		Médio	2.500	30	100	100	
		High	250.000	30	100	100	

*Não testado em ambos os sistemas devido a volume insuficiente de amostra

Tabela 14: Estudo de concordância do painel clínico misturado com rRNA de GC (continua)

Espécime		Membro do Painel	Concentração (fg rRNA/ensaio)	Réplicas	% Concor-dância TIGRIS	% Concor-dância DTS	Concordância % global entre TIGRIS e DTS (IC de 95%)
Urina feminina	Estudo inicial	Sem alvo	0	12	100	100	75,8 (67,5 - 82,8)
		Muito baixo	25	30	13,3 (4/30)	100	
		Baixa	250	30	80 (24/30)	100	
		Médio	2.500	30	100	100	
		High	250.000	30	100	100	
	Seguimento 1	Sem alvo	0	18	100	100	99,3 (96,0 - 100)
		Muito baixo	25	30	96,7 (29/30)	100	
		Baixa	250	30	100	100	
		Médio	2.500	30	100	100	
		High	250.000	30	100	100	
	Seguimento 2	Sem alvo	0	18	100	100	97,8 (93,8 - 99,5)
		Muito baixo	25	30	90 (27/30)	100	
		Baixa	250	30	100	100	
		Médio	2.500	30	100	100	
		High	250.000	30	100	100	
Citologia em base líquida PreservCyt		Sem alvo	0	12	100	100	100 (97,2 - 100)
		Muito baixo	25	30	100	100	
		Baixa	250	30	100	100	
		Médio	2.500	30	100	100	
		High	250.000	30	100	100	

*Não testado em ambos os sistemas devido a volume insuficiente de amostra

Estudo de Equivalência de Especificidade Analítica

Para um ensaio de amplificação do ácido nucleico, a especificidade analítica a respeito dos organismos individuais é grandemente determinada mais pela química do ensaio (ex.: sequências oligonucletídeas) do que pela plataforma. Dado que os reagentes para o ensaio APTIMA GC são idênticos entre o Sistema TIGRIS DTS e os Sistemas DTS, foram concebidas experiências de especificidade analítica no Sistema TIGRIS DTS dedicadas aos isolados de culturas mais complicados. Estes organismos incluíram aqueles conhecidos por efectuarem reacção cruzada em outros ensaios de amplificação. Foram seleccionados 24 isolados de culturas do painel de organismos da Tabela 11, incluindo 17 organismos mais intimamente relacionados com GC. Todos os organismos testados deram resultados negativos, à excepção de um (1/648) resultado falso positivo. Isto foi observado com *C. pneumoniae*, em que 1 replicado de 27 testados deu um resultado falso. A repetição do teste não confirmou a reactividade cruzada com este organismo *(C. pneumoniae)*, pois não foram observados testes positivos com 6 replicados do teste adicionais.

Estudos de Equivalência de Substâncias Interferentes

O sangue total, uma substância encontrada com frequência em espécimes urogenitais e que se sabe interferir com alguns ensaios de amplificação, foi utilizado para estabelecer que o Sistema TIGRIS DTS tolera níveis de substâncias potencialmente interferentes semelhantes aos tolerados pelos Sistemas DTS. Foi adicionado sangue total a esfregaços

clínicos, esfregaços vaginais, urina e grupos de espécimes citológicos líquidos em PreservCyt, tendo-se depois testado a potencial interferência no ensaio na ausência e na presença de alvo de GC ao equivalente de rRNA estimado de 50 CFU GC/ensaio (250 fg/ensaio). Os equivalentes rRNA foram calculados com base no tamanho do genoma e a taxa estimada média/célula DNA:RNA de cada organismo. Os espécimes foram testados em dois Sistemas TIGRIS DTS. Todas as amostras contendo ácidos nucleicos alvo foram positivas quando testadas a uma concentração de sangue de 10% em espécimes de esfregaços, esfregaços vaginais, espécimes citológicos em base líquida PreservCyt e 30% de sangue em espécimes de urina. Todas as amostras que não continham alvo deram resultados negativos para GC. Estes resultados indicam que, nos níveis testados, é improvável que o sangue total afecte o resultado de GC no Sistema TIGRIS DTS.

Estudos de transmissão com o Sistema TIGRIS DTS

Para estabelecer que o Sistema TIGRIS DTS minimiza o risco de resultados positivos falsos causados por contaminação por transmissão, foi feito um estudo utilizando painéis misturados em três Sistemas TIGRIS DTS. O estudo utilizou 20% de amostras GC de alvo alto contendo 1,0 x 10^9 células/reacção, que foram aleatoriamente espaçadas entre 80% de amostras negativas contendo meio de transporte de esfregaço. No estudo, 576 amostras de alvo elevado e 2.376 amostras negativas foram testadas com os três Sistemas TIGRIS DTS. A Tabela 15 mostra que a média da taxa global de transmissão foi de 0,21% (5/2.370). Um total de 6 amostras negativas foi verificado como inválido e excluído do cálculo. Uma análise separada foi executada numa divisão da população do estudo composta das amostras negativas que imediatamente seguiram um alvo alto positivo. A taxa de transmissão para este subgrupo da população foi, em média de 0,95% (4/422). Relativamente aos falsos positivos neste subgrupo, a taxa de transmissão variou entre 0% e 2,16% entre os três Sistemas TIGRIS DTS. Estes resultados demonstram que a contaminação de transmissões é minimizada no Sistema TIGRIS DTS.

Tabela 15: Resumo da transmissão global no Sistema TIGRIS DTS

Instrumento	n.º testes negativos válidos	n.º total de resultados positivos falsos GC	% Resultados positivos falsos GC	Intervalos de confiança (IC de 95%)
TIGRIS 1	787	0[a]	0,00	0,00 - 0,38
TIGRIS 2	791	1[b]	0,13	0,00 - 0,70
TIGRIS 3	792	4[c]	0,51	0,14 - 0,29
Todos os instrumentos	2.370	5	0,21	0,07 - 0,49

a. O Sistema TIGRIS DTS 1 não apresentou resultados positivos falsos para GC directamente após um positivo de alvo elevado.

b. O Sistema TIGRIS DTS 2 apresentou um resultado positivo falso para GC directamente após um positivo de alvo elevado.

c. O Sistema TIGRIS DTS 3 apresentou três resultados positivos falsos para GC directamente após um positivo de alvo elevado.

Desempenho analítico no Sistema PANTHER

Estudo de concordância do painel clínico misturado

Espécimes de urina negativos individuais foram misturados com GC para criar um painel de 120 positivos para GC. Os membros do painel de positivos para GC foram misturados com organismos a 12,5 CFU/mL, 125 CFU/mL ou 1.250 CFU/mL (25 fg/ensaio, 250 fg/ensaio ou 2.500 fg/ensaio). Além disso, foram colhidos 120 espécimes de urina negativos para GC. Os painéis positivos e negativos foram testados em três Sistemas PANTHER e em três Sistemas TIGRIS DTS. A concordância percentual positiva entre o Sistema PANTHER e o Sistema TIGRIS DTS foi de 100%, com um intervalo de confiança inferior a 95%, de 98,9. A concordância percentual negativa entre o Sistema PANTHER e os Sistemas TIGRIS DTS foi de 100%, com um intervalo de confiança inferior a 95%, de 98,9. Os resultados do estudo são apresentados na Tabela 16.

Tabela 16: Estudo de concordância do painel clínico misturado: concordância com os resultados esperados para GC

Membro do Painel	Concentração		Réplicas	TIGRIS % Concordância	PANTHER % Concordância
	CFU/mL	fg/ensaio			
Positivo muito baixo	12,5	25	117	100	100
Positivo baixo	125	250	120	100	100
Positivo médio	1.250	2.500	120	100	100
Negativo	0	0	360	100	100

Concordância percentual geral de positivos entre Sistema TIGRIS DTS e Sistema PANTHER (IC de 95%): 100% (98,9 - 100).

Concordância percentual geral de negativos entre Sistema TIGRIS DTS e Sistema PANTHER (IC de 95%): 100% (98,9 - 100).

Estudo de sensibilidade analítica

A sensibilidade analítica do ensaio APTIMA GC foi testada utilizando três matrizes de amostras representativas. Estas foram urina processada com meio de transporte para urina (Urine Transport Medium, UTM), solução citológica líquida PreservCyt diluída com meio de transporte para esfregaços (Swab Transport Medium, STM) e STM. Foi misturado rRNA de GC a grupos destas três matrizes nas seguintes concentrações: 25 fg/ensaio, 250 fg/ensaio e 2.500 fg/ensaio (equivalentes de rRNA de 12,5 CFU/mL, 125 CFU/mL ou 1.250 CFU/mL). Os equivalentes de rRNA foram calculados com base no tamanho do genoma e na razão DNA:RNA/célula de cada organismo. Estes painéis foram testados em três instrumentos PANTHER utilizando dois lotes de reagentes em replicados de 96. A concordância positiva com o resultados esperado foi calculada. A concordância com os resultados esperados foi de 100% (IC de 95% 96,2 - 100%) para todos os painéis de urina, 100% (IC de 95% 96,2 - 100%) para todos os painéis de espécimes citológicos em base líquida PreservCyt e de 100% (IC de 95% 96,1 - 100%) para todos os painéis de STM. A sensibilidade analítica para o ensaio é de 125 CFU/mL.

Estudo de reprodutibilidade

A precisão do ensaio APTIMA GC foi avaliada entre três Sistemas PANTHER e dois lotes de kits de ensaio APTIMA GC durante um período de 24 dias. Os painéis foram efectuados misturando rRNA de GC em STM nas concentrações indicadas na Tabela 17. Os operadores realizaram dois testes por dia, analisando cada membro do painel em duplicado por teste. Foi calculada a concordância com o resultado esperado e a precisão foi estimada de acordo com as Orientações EP5-A2 do NCCLS (14). O número de replicados de cada painel foi de 96. A Tabela 17 apresenta os dados de precisão de RLU em termos de média, desvio padrão, coeficiente de variação (CV), concordância percentual com os resultados esperados e cálculos de variabilidade entre instrumentos, entre lotes, entre testes e intrateste.

Tabela 17: Precisão do Sistema PANTHER para o ensaio APTIMA GC

Matriz	GC (CFU/mL)	n	Média de RLU (x1.000)	% Concd	Entre instrumentos		Entre Lotes		Entre Testes		Intrateste		Total	
					DP (x1.000)	CV (%)	DP (x1.000)	CV (%)	DP (x1.000)	CV (%)	DP (x1.000)	CV (%)	DP (x1.000)	CV (%)
STM	0	96	3	100	0	0	0	0	0	0	2,01	72,8	2	72,5
	12,5	96	3.951	100	215,14	5,4	0	0	0	0	568,24	14,4	607,6	15,4
	125	95*	5.839	100	370,17	6,3	0	0	0	0	772,58	13,2	856,7	14,7
	1.250	96	6.207	100	338,25	5,4	0	0	0	0	787,64	12,7	857,2	13,8
Urina	0	95*	3	100	0,69	21,6	0,81	25,5	0,77	24,2	2,43	76,3	2,8	87,8
	12,5	96	3.460	100	0	0	195,84	5,7	113,27	3,3	207,53	6	307	8,9
	125	96	6.047	100	158,67	2,6	170,32	2,8	0	0	206,24	3,4	311	5,1
	1.250	96	6.737	100	218,35	3,2	238,49	3,5	66,22	1	176,72	2,6	374,4	5,6
PreservCyt	0	95*	6	100	1,9	33,6	0	0	0,54	9,5	5,96	105,2	6,3	111,2
	12,5	96	3.358	100	257,9	7,7	0	0	0	0	485,45	14,5	549,7	16,4
	125	96	5.272	100	243,09	4,6	201,89	3,8	0	0	751,72	14,3	815,4	15,5
	1.250	96	5.945	100	355,95	6	51,06	0,9	0	0	759,35	12,8	840,2	14,1

Nota: A variabilidade proveniente de alguns factores pode ser numericamente negativa, o que pode ocorrer se a variabilidade devido a esses factores for muito pequena. Quando isto ocorre, DP = 0 e CV = 0%.

* o n de 95 indicou um replicado inválido, em 96, que não foi repetido.

Especificidade Analítica

A especificidade analítica não foi testada no instrumento PANTHER. Consulte a secção *Desempenho analítico no Sistema TIGRIS DTS* para obter o *Estudo de Equivalência de Especificidade Analítica*.

Estudos de Equivalência de Substâncias Interferentes

Sangue comummente encontrado em espécimes urogenitais pode interferir em alguns ensaios de amplificação. Foi utilizando sangue total para estabelecer o grau de interferência do sangue no Sistema PANTHER relativamente a este potencial interferente. Adicionou-se sangue fresco a conjuntos clínicos de esfregaços vaginais, espécimes citológicos em base líquida PreservCyt pós-processados ou espécimes de urina, que depois foram testados para detectar uma potencial interferência com o ensaio na presença e na ausência de alvo de GC. Foi utilizado como concentração alvo o equivalente em rRNA de 125 CFU de GC/mL (250 fg/ensaio), pois este representa a sensibilidade analítica do ensaio. Os espécimes foram testados no Sistema PANTHER. Todas as amostras contendo ácidos nucleicos alvo foram positivas quando testadas a uma concentração de sangue de 10% (v/v) em esfregaços ou em espécimes citológicos em base líquida PreservCyt, ou de 30% (v/v)

em espécimes de urina. Todas as amostras que não continham alvo foram correctamente identificadas como negativas. Estes resultados são idênticos aos demonstrados para o Sistema TIGRIS DTS quando misturados com quantidades de sangue semelhantes. O sangue adicionado a esfregaços, PreservCyt e espécimes de urina a concentrações muito superiores às que serão de esperar numa colheita normal de espécimes não interferiu com os resultados no Sistema PANTHER.

Estudos de transmissão com o Sistema PANTHER

Para estabelecer que o Sistema PANTHER minimiza o risco de resultados positivos falsos causados por contaminação por transmissão, foi feito um estudo analítico de múltiplos testes utilizando painéis misturados em três Sistemas PANTHER. A transmissão foi avaliada utilizando aproximadamente 20% de amostras de GC de título elevado dispersas entre amostras negativas. Os testes incluíram agregados de amostras fortemente positivas com agregados de amostras negativas, assim como positivos fortes únicos dispersos segundo um padrão específico pelo teste. As amostras de título elevado foram preparadas utilizando rRNA de GC misturado em STM de forma a obter uma concentração final de 5 x 10^5 fg rRNA/reacção (equivalente em rRNA de 2,5 x 10^5 CFU/mL). As análises foram realizadas utilizando 5 testes em três Sistemas PANTHER, num total de 2.923 amostras negativas. A taxa de transmissão global foi de 0%, com um intervalo de confiança de 95% de 0 - 0,1%. No total, 17 amostras negativas dos testes de título elevado foram declaradas inválidas e excluídas dos cálculos.

Bibliografia

1. **Centers for Disease Control and Prevention**. 2002. Screening Tests to Detect *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* infections. United States Morbid. and Mortal. Weekly Rep. **51** (RR-15).
2. **Centers for Disease Control and Prevention.** 2011. *Sexually Transmitted Disease Surveillance 2010*. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services. November.
3. **Ching, S., H. Lee, E. W. Hook, III, M. R. Jacobs, and J. Zenilman.** 1995. Ligase chain reaction for detection of *Neisseria gonorrhoeae* in urogenital swabs. J. Clin. Microbiol. **33**:3111-3114.
4. **Chong, S., D. Jang, X. Song, J. Mahony, A. Petrick, P. Barriga, and M. Chernesky.** 2003. Specimen Processing and Concentration of *Chlamydia trachomatis* Added Can Influence False-Negative Rates in the LCx Assay but Not in the APTIMA Combo 2 Assay When Testing for Inhibitors. J. Clin. Microbiol. **41**:778-782.
5. **CUMITECH 31**. Verification and Validation of Procedures in the Clinical Microbiology Laboratory.- ASM PRESS, FEBRUARY 1997.
6. **Farrel, D. J.** 1999. Evaluation of AMPLICOR *Neisseria gonorrhoeae* PCR using cppB nested PCR and 16S rRNA PCR. J. Clin. Microbiol. **37**:386-390.
7. **Gaydos, C. A., T. C. Quinn, D. Willis, A. Weissfeld, E. W. Hook, D. H. Martin, D. V. Ferraro, and J. Schachter.** 2003. Performance of the APTIMA Combo 2 Assay for Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in Female Urine and Endocervical Swab Specimens. J. Clin. Microbiol. **41**:304-309.
8. **Holmes, K. K., H. H. Handsfield, S. P. Wang, B. B. Wentworth, M. Turck, J. B. Anderson, and E. R. Alexander**. 1975. Etiology of nongonococcal urethritis. NEJM **292**:1199-1205.
9. **Hook III, E. W. and H. H. Handsfield.** 1999. Gonococcal Infections in the Adult. p. 458. In K. Holmes et. al. (eds.) Sexually Transmitted Diseases. McGraw Hill, New York, N.Y.
10. **Krauss, S. J., R. C. Geller, G. H. Perkins, and D. L. Rhoden.** 1976. Interference of *Neisseria gonorrhoeae* growth by other bacterial species. J. Clin. Microbiol. 4:288-295.
11. **Masi, A. T., and B. I. Eisenstein.** 1981. Disseminated Gonococcal Infections (DGI) and Gonococcal Arthritis (GCA): II Clinical Manifestations, Diagnosis, Complications, Treatment and Prevention. Semin. Arthritis Rheum. **10**:173.
12. **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** 1999. NCCLS EP5-A. Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices; Approved Guideline (Vol. 19, No. 2).
13. **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** 2002. NCCLS EP12-A. User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline for additional guidance on appropriate internal quality control testing practices.
14. **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** 2004. NCCLS EP5-A2: Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods: Approved Guideline (2nd edition, Vol. 24, No. 25).
15. **Peterson E. M., V. Darrow, J. Blanding, S. Aarnaes, and L. M. de La Maza.** 1997. Reproducibility problems with the AMPLICOR PCR *Chlamydia trachomatis* test, J. Clin. Microbiol. **35**:957-959.

16. **Schachter, J.** 1985. Chlamydiae (Psittacosis-Lymphogranuloma Venereum-Trachoma group), p. 856-862. *In* E. H. Lennette, et al. (ed.), Manual of Clinical Microbiology, 4th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
17. **Schachter, J., and M. Grossman.** 1981. Chlamydial infections. Ann. Rev. Med. **32**:45-61.
18. **Schachter, J.** 1978. Medical progress: chlamydial infections (third of three parts). NEJM **298**:540-549.
19. **Schachter, J., E. C. Hill, E. B. King, V. R. Coleman, P. Jones, and K. F. Meyer.** 1975. Chlamydial infection in women with cervical dysplasia. Am. J. Obstet. Gynecol. **123**:753-757.
20. **Stary, A., E. Schuh, M. Kerschbaumer, B. Gotz, and H. Lee**. 1998. Performance of transcription-mediated amplification and Ligase chain reaction assays for detection of chlamydial infection in urogenital samples obtained by invasive and noninvasive methods. J. Clin. Microbiol. **36**:2666-2670.
21. **Toye, B., W. Woods, M. Bobrowska, and K. Ramotar.** 1998. Inhibition of PCR in genital and urine specimens submitted for *Chlamydia trachomatis* testing. J. Clin. Microbiol. **36**:2356-2358.
22. **Verkooyen, R. P., A. Luijendijk, W. M. Huisman, W. H. F. Goessens, J. A. J. W. Kluytmans, J. H. Rijsoort-Vos, and H. A. Verbrugh.** 1996. Detection of PCR inhibitors in cervical specimens by using the AMPLICOR *Chlamydia trachomatis* assay. J. Clin. Microbiol. **34**:3072-3074.
23. **Vincelette, J., J. Schirm, M. Bogard, A. Bourgault, D. Luijt, A. Bianchi, P. C. Van Voorst Vader, A. Butcher, and M. Rosenstraus.** 1999. Multicenter evaluation of the fully automated COBAS AMPLICOR PCR test for detection of *Chlamydia trachomatis* in urogenital specimens. J. Clin. Microbiol. **37**:74-80.

Gen-Probe Incorporated
San Diego, CA 92121

Informações para contacto nos EUA e a nível internacional:
Assistência ao cliente: +1 858 410 8002
customerservice@gen-probe.com
Assistência técnica: +1 858 410 8511
technicalsupport@gen-probe.com

Número de telefone gratuito nos EUA e Canadá:
Assistência ao cliente: +1 800 523 5001
Assistência técnica: +1 888 484 4747

www.gen-probe.com

EC REP

EMERGO EUROPE
Molenstraat 15
2513 BH, Haia
Países Baixos

GEN-PROBE, GEN-PROBE e desenho, APTIMA, APTIMA e desenho, APTIMA COMBO 2, DTS, LEADER, PANTHER, SB100 e TIGRIS são marcas comerciais da Gen-Probe Incorporated.

eppendorf (estilizado) e REPEATER são marcas comerciais da Eppendorf AG.

PRESERVCYT e THINPREP são marcas comerciais da Hologic, Inc.

KOVA-TROL é uma marca registada da Hycor Biomedical, Inc.

RAININ é uma marca registada da Rainin Instrument, LLC.

TECAN e FREEDOM EVO são marcas comerciais da Tecan Group AG.

Qualquer outra marca que apareça neste documento pertence a seu respectivo proprietário.

© 2003–2013 Gen-Probe Incorporated

502185PT Rev. E
2013-05